

AUTOREFERAT

DR NATALIA SZÓSTAK

ZAŁĄCZNIK 3

IMIĘ I NAZWISKO

NATALIA SZÓSTAK

POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

- 2018** **Stopień doktora** nauk technicznych, dyscyplina informatyka
Politechnika Poznańska
Wydział Informatyki
Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Błazewicz
Tytuł: „*Bioinformatyczne metody modelowania i weryfikacji hipotezy Świata RNA*”
- 2010** **Stopień magistra** biologii (spec. bioinformatyka)
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii, Laboratorium Bioinformatyki
Promotor: prof. dr hab. Janusz Bujnicki
Tytuł: “*Opracowanie programu RNAmapp2D do wizualizacji i analizy map kontaktów i odległości wewnątrz- i międzycząsteczkowych w RNA i kompleksach białko-RNA*”

INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- | | |
|--------------------|--|
| 02.2020 – obecnie | Adiunkt, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk |
| 08.2018 – 12.2018 | Starszy specjalista ds. naukowo-technicznych, Instytut Informatyki, Politechnika Poznańska |
| 03.2016 – 12. 2018 | Asystent, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk |

OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ

TYTUŁ

Rola mykobioty jelitowej człowieka w homeostazie organizmu i patogenezie chorób nowotworowych

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA

- H1.** **Szóstak N***, Szymanek A*, Havránek J, Tomela K, Rakoczy M, Samelak-Czajka A, Schmidt M, Figlerowicz M, Majta J, Milanowska-Zabel K, Handschuh L, Philips A. The standardisation of the approach to metagenomic human gut analysis: from sample collection to microbiome profiling. *Scientific Reports* 12 (1), 8470 (2022). doi: 10.1038/s41598-022-12037-3
IF₂₀₂₂ = 4,6; 5IF₂₀₂₂ = 4,9; MNiSW: 140
- H2.** **Szóstak N**, Handschuh L, Samelak-Czajka A, Tomela K, Schmidt M, Pruss Ł, Milanowska-Zabel K, Kozłowski P, Philips A. Host factors associated with gut mycobiome structure. *mSystems* 8 (2), e00986-22 (2023). doi: 10.1128/msystems.00986-22
IF₂₀₂₃ = 5; 5IF₂₀₂₃ = 6,1; MNiSW: 140

- H3.** Szóstak N, Handschuh L, Samelak-Czajka A, Tomela K, Pietrzak B, Schmidt M, Kaczmarek M, Galus Ł, Mackiewicz J, Mackiewicz A, Kozłowski P, Philips A. Gut Mycobiota Dysbiosis Is Associated with Melanoma and Response to Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Immunology Research* 12 (4), 427-439 (2024). doi: 10.1158/2326-6066.CIR-23-0592

IF₂₀₂₃ = 8,1; 5IF₂₀₂₃ = 10,1; MNiSW: 200

- H4.** Szóstak N[#], Budnik M, Tomela K, Handschuh L, Samelak-Czajka A, Pietrzak B, Schmidt M, Kaczmarek M, Galus Ł, Mackiewicz J, Mackiewicz A, Kozłowski P, Philips A. Exploring correlations between gut mycobiome and lymphocytes in melanoma patients undergoing anti-PD-1 therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 74, 110 (2025). doi: 10.1007/s00262-024-03918-9

IF₂₀₂₃ = 4,6; 5IF₂₀₂₃ = 5,4; MNiSW: 140

- H5.** Szóstak N, Figlerowicz M, Philips A. The emerging role of the gut mycobiome in liver diseases. *Gut Microbes* 15 (1), 2211922 (2023). doi: 10.1080/19490976.2023.2211922

IF₂₀₂₃ = 12,2; 5IF₂₀₂₃ = 12,3; MNiSW: 100

*równy wkład

autor korespondencyjny

OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA

Omówione poniżej badania, składające się na moje osiągnięcie naukowe, zatytułowane „*Rola mykobioty jelitowej człowieka w homeostazie organizmu i patogenezie chorób nowotworowych*” realizowałam w latach 2020-2025 w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN (ICHB PAN) w Poznaniu. Moje osiągnięcie naukowe stanowi zbiór pięciu wieloautorskich publikacji, z których cztery przedstawiają wyniki oryginalnych badań, jedna natomiast stanowi krytyczną syntezę dotychczasowej wiedzy. Prace są opublikowane w modelu otwartego dostępu (ang. *open access*). We wszystkich pracach jestem pierwszą autorką, w jednej jestem ponadto autorką korespondencyjną. Pliki rzeczonych publikacji w formacie PDF zostały dołączone do elektronicznej wersji wniosku.

WPROWADZENIE

W ostatnich latach mikrobiomy różnych środowisk, w tym zróżnicowany mikrobiom ludzkiego ciała, przyciągnęły dużą uwagę społeczności naukowej. Szczególne zainteresowanie budzi mikrobiota jelitowa, która odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy oraz w patogenezie wielu chorób. Te dynamiczne i różnorodne ekosystemy mikroorganizmów, obejmujące przedstawicieli różnych królestw biologicznych, stanowią obecnie jeden z kluczowych obszarów badań biomedycznych. Dotychczas uwaga badaczy koncentrowała się głównie na bakteriach, które stanowią najliczniejszy komponent mikrobioty jelitowej, podczas gdy rola innych mikroorganizmów, w tym grzybów jelitowych, określanych mianem mykobioty, przez długi czas pozostawała marginalizowana. Rozwój nowoczesnych metod sekwencjonowania następnej generacji (NGS) oraz zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych umożliwił jednak głębsze poznanie składu mikrobiomu, ujawniając, że oprócz bakterii, także inne mikroorganizmy, w tym grzyby, pełnią kluczowe role w kształtowaniu zdrowia człowieka (Zhang i in. 2021; Pérez 2021; Wu i in. 2021).

Coraz liczniejsze dowody wskazują na związek pomiędzy zaburzeniami w składzie mykobioty jelitowej a rozwojem różnych schorzeń, takich jak choroby autoimmunologiczne (X. V. Li, Leonardi, i Iliev 2019;

Underhill i Iliev 2014), metaboliczne (X. Zhou, Zhang, i Yu 2024; Bao i in. 2023) oraz nowotworowe (Narunsky-Haziza i in. 2022; Dohlman i in. 2022; Aykut i in. 2019). Uważa się, że niektóre z gatunków grzybów bytujących w ludzkich jelitach mają korzystne działanie, jak na przykład *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (Ansari i in. 2021), będący składnikiem probiotyków oferowanych na rynku. Inne, takie jak niektóre gatunki *Candida* i *Aspergillus*, są uznawane za szkodliwe. Przyjmuje się także, że wpływ grzybów jelitowych na organizm gospodarza wiąże się z produkcją szerokiej gamy metabolitów, które silnie oddziałują na szlaki metaboliczne (Kew 2013). Ponadto składniki ściany komórkowej grzybów (w tym chityna, β -glukan i mannan) mogą oddziaływać z układem odpornościowym gospodarza, wywołując odpowiedzi prozapalne (Briard i in. 2021; Rizzetto i in. 2016). Biorąc pod uwagę, że stan zapalny jest kluczowym czynnikiem przyczyniającym się do rozwoju nowotworów (Multhoff, Molls, i Radons 2012; J. Yu i in. 2016), zmieniony profil mikrobiologiczny może skutkować utrzymywaniem się ogólnoustrojowego stanu prozapalnego, potencjalnie sprzyjającego procesom nowotworzenia (Neagu i in. 2019; S. L. Schneider, Ross, i Grichnik 2015). W szczególności w tym kontekście pojawiają się sugestie, że mykobiota jelitowa może mieć istotny wpływ na odpowiedź pacjentów na leczenie immunologiczne. Mimo tego, mechanizmy leżące u podstaw tych interakcji pozostają słabo poznane i wymagają dalszego zgłębienia.

Trudność w odkrywaniu roli mykobioty jelitowej w procesach chorobowych oraz jej wpływu na powodzenie immunoterapii wynika m.in. z ograniczonej wiedzy na temat jej składu i zmienności. Do tej pory nie osiągnięto konsensusu w kwestii istnienia stałego komponentu mykobioty jelitowej (ang. *core mycobiome*) ani jego składu, a także tego, czy grzyby tworzą długoterminową, stabilną społeczność w ludzkim jelicie. Zasugerowano, że zmiany w składzie mykobioty mogą być związane z wieloma czynnikami, takimi jak genotyp gospodarza, płeć, wiek, choroby współistniejące, leki, styl życia, status społeczno-ekonomiczny, dieta. Do tej pory jednak związki między czynnikami związanymi z gospodarzem a mykobiotą jelitową człowieka były głównie badane w chińskich kohortach (Y. Sun i in. 2021), z zauważalnym wyjątkiem badań poświęconych analizie Projektu Ludzkiego Mikrobiomu, w którym 317 próbek kału od zdrowych dawców zostało scharakteryzowanych pod kątem grzybów jelitowych (Nash i in. 2017). Inne istniejące badania były wąskie i skoncentrowane głównie na konkretnych aspektach, takich jak badania mykobioty jelitowej w odniesieniu do diety (Hoffmann i in. 2013), wieku i płci (Strati i in. 2016), wskaźnika masy ciała (BMI) (Borges i in. 2018), specyficznych chorób, np. chorób wątroby (Gao i in. 2021; Zeng i Schnabl 2022), zespołu jelita drażliwego (Das i in. 2021; G. Hong i in. 2020), chorób autoimmunologicznych (Ben-Ami, Lewis, i Kontoyiannis 2010; Chiaro i Round 2021; Zhai i in. 2020) oraz antybiotyków (Jiang i in. 2017; Krause i Reisinger 2005; Samonis i in. 1993; Seelbinder i in. 2020).

Analizując związki między mykobiotą a czynnikami związanymi z gospodarzem, należy pamiętać, że czynniki te mogą się znacznie różnić w zależności od regionu geograficznego i kultury, podobnie jak środowisko i genotypy w różnych populacjach. Wyniki analiz mykobioty jelitowej oraz wnioski wyciągnięte na ich podstawie powinny być zatem rozpatrywane w kontekście socjodemografii oraz geografii. Ze względu na znaczące różnice w diecie, stylu życia i czynnikach środowiskowych między Chinami a krajami Zachodu, wyniki badań opartych na chińskich kohortach mogą nie być w pełni zastosowalne do innych populacji. Dlatego, aby lepiej zrozumieć zależności między mykobiotą jelitową a różnymi czynnikami, kluczowe jest przeprowadzanie analiz na różnych kohortach, najlepiej o dużej liczbie badanych, co pozwoli na uzyskanie pełniejszego obrazu tych zależności.

Ponadto, pomimo rosnącej liczby badań metagenomicznych, standardowa procedura analizy danych metagenomicznych wciąż jest przedmiotem dyskusji. Ze względu na ogromną złożoność i zmienność społeczności mikrobiologicznych, badanie składu mikroorganizmów jelitowych z kału wiąże się z występowaniem tzw. *batch effect*, który może powodować niekompatybilność różnych zestawów danych, nawet w ramach projektów pochodzących z tego samego badania i/lub laboratorium (Schloss

2018). Efekt ten wynika z systematycznych różnic spowodowanych czynnikami technicznymi, takimi jak sposób przygotowania próbek, rodzaj użytego sprzętu czy zastosowane metody analizy, co może prowadzić do zniekształcenia wyników i ograniczać ich porównywalność. W konsekwencji porównywanie wyników uzyskanych przez różnych badaczy (co stanowi standardowe podejście w genomice człowieka) staje się utrudnione w badaniach metagenomicznych.

Biorąc pod uwagę powyższe, jak również ciągle rosnącą ilość danych generowanych w eksperymentach metagenomicznych, konieczne jest ustanowienie jasnych standardów analitycznych. Brak jednolitych protokołów i szeroka różnorodność metodologiczna stanowią istotne wyzwanie, ograniczając porównywalność wyników między różnymi badaniami, a także utrudniając identyfikację uniwersalnych markerów prognostycznych, które mogłyby mieć znaczenie w kontekście zdrowia publicznego oraz terapii. I chociaż najlepsze praktyki w badaniach metagenomicznych były przedmiotem kilku publikacji (D'Amore i in. 2016; Quince i in. 2017; Wesolowska-Andersen i in. 2014) a także stanowią główny cel projektu Międzynarodowego Standardu Mikrobiomu Ludzkiego (IHMS), standaryzacja procedur analizy danych metagenomicznych wciąż jest daleka.

Wreszcie, otwartym pozostaje pytanie, na ile wpływ mykrobioty jelitowej może być uniwersalny w kontekście różnych chorób, w tym chorób wątroby, autoimmunologicznych czy nowotworowych, oraz jak te interakcje mogą zmieniać się w zależności od specyficznych warunków patologicznych. Choć istnieją sugestie, że zaburzenia w składzie mykrobioty mogą mieć podobny wpływ na zdrowie w różnych jednostkach chorobowych, kluczowe jest dalsze badanie, w jaki sposób mykrobiota jelitowa może oddziaływać na różne narządy i mechanizmy molekularne, które prowadzą do rozwoju chorób. Zrozumienie tych procesów może mieć ogromne znaczenie dla opracowania nowych strategii terapeutycznych, które uwzględniają rolę mikrobioty jelitowej w leczeniu chorób.

MOTYWACJA I CEL BADAŃ

Motywacja do moich badań wynikała z rosnącej świadomości o kluczowej roli mikrobiomu jelitowego w zdrowiu człowieka oraz w patogenezie różnych stanów chorobowych. Mikrobiom jelitowy, a w tym mykrobiota, odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu i regulacji odpowiedzi immunologicznej, co ma bezpośrednie znaczenie dla skuteczności leczenia, szczególnie w kontekście immunoterapii. Z uwagi na fakt, że dotychczasowe badania koncentrowały się na bakteriach, przez co w literaturze brakuje wystarczających danych dotyczących roli mykrobioty jelitowej, postanowiłam w swoich badaniach skoncentrować się na tym aspekcie.

Głównym celem moich badań było zglebienie roli mykrobioty jelitowej człowieka w kontekście patogenezy chorób, ze szczególnym uwzględnieniem chorób nowotworowych, oraz jej wpływu na skuteczność leczenia, zwłaszcza immunoterapią. Aby osiągnąć ten cel, konieczne było sprostanie wyzwaniom związanym z badaniami metagenomicznymi, takimi jak wpływ metodologii badawczej na wyniki profilowania składu jelitowego na podstawie próbek kału oraz ograniczona wiedza w zakresie mykrobioty jelitowej człowieka i jej naturalnej zmienności.

Pierwszym etapem było (i) opracowanie i standaryzacja protokołu pozyskiwania oraz analizowania danych metagenomicznych, szczególnie w zakresie profilowania składu mikrobioty jelitowej z próbek kału (H1). Było to kluczowe dla uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych wyników w kolejnych częściach badań. Następnie (ii) skoncentrowałam się na scharakteryzowaniu mykrobioty jelitowej u zdrowych ochotników z Polski, badając wpływ czynników demograficznych, diety oraz stylu życia na skład mykrobioty (H2). Wyniki tej części badań pozwoliły na lepsze zrozumienie naturalnej zmienności w składzie mykrobioty oraz jej związków z ogólnym stanem zdrowia człowieka.

Kolejnym celem było (iii) zbadanie różnic w składzie mykobioty jelitowej pomiędzy zdrowymi osobami a pacjentami z nowotworami, a także ocena wpływu składu mykobioty na efektywność immunoterapii (H3). W tym celu wykorzystywałam próbki kału pobrane od pacjentów chorych na czerniaka, którzy byli leczeni terapią anty-PD-1 lub przyjmowali szczepionkę. Hipoteza badawcza zakładała, że mykobiota pacjentów onkologicznych różni się od mykobioty zdrowych osób, a skład mikrobioty może mieć wpływ na odpowiedź na immunoterapię. Uzyskane wyniki potwierdziły tę hipotezę, co skłoniło mnie do dalszych badań nad potencjalnymi powiązaniem między poszczególnymi gatunkami grzybów a odpowiedzią immunologiczną u pacjentów.

Aby odpowiedzieć na to pytanie (iv) przeanalizowałam korelacje pomiędzy poszczególnymi podtypami limfocytów typu B i T a gatunkami grzybów zidentyfikowanymi u pacjentów z czerniakiem (H4). Wyniki tych analiz wykazały, że skład mykobioty jelitowej może mieć potencjał do modulowania aktywności limfocytów, co może wpływać na skuteczność terapii anty-PD-1 i dalszy przebieg leczenia. Wreszcie (v) podjęłam się również krytycznej analizy i systematyzacji wiedzy na temat roli mykobioty jelitowej w kontekście innych chorób, w tym chorób wątroby, aby sprawdzić, czy podobne mechanizmy mogą występować również w innych układach i jednostkach chorobowych (H5). Ta część badań dostarczyła nowych wskazówek dotyczących potencjalnych uniwersalnych mechanizmów oddziaływania mykobioty na zdrowie człowieka.

STANDARYZACJA PROTOKOŁU POZYSKANIA I ANALIZY DANYCH METAGENOMICZNYCH Z KAŁU

Pierwszym celem mojej pracy była standaryzacja protokołu pozyskania i analizy danych metagenomicznych z kału, co stanowi kluczowy krok w zapewnieniu wiarygodności wyników badań mikrobiomu jelitowego (H1). Wzrost liczby badań metagenomicznych w ostatnich latach uwydatnił potrzebę ujednolicenia procedur, aby zredukować czynniki zakłócające pochodzące z izolacji DNA, sekwencjonowania oraz analiz bioinformatycznych. Tylko w ten sposób możliwe jest zapewnienie, że obserwowane różnice w składzie mikrobiomu są rzeczywistymi efektami biologicznymi, a nie wynikiem odmiennych metodologii. Aby odpowiedzieć na pytanie, jak poszczególne etapy i używane w nich metody wpływają na wyniki profilowania składu mikrobiomu jelitowego określanego na podstawie próbek kału, przeanalizowałam wpływ kilku kluczowych kroków procedury przygotowania i analizy danych metagenomicznych.

Pierwszym etapem, który podlegał bezpośredniej analizie była izolacja DNA z kału. Kluczowym czynnikiem, który zdaje się odgrywać rolę na tym etapie jest czas homogenizacji próbek przed izolacją. Aby zbadać wpływ czasu na uzyskiwane profile taksonomiczne użyto komercyjnie dostępnej mieszanki bakteryjnej ATCC Bacterial Mix MSA-2006 będącej mieszanką 12 znanych bakterii (dalej zwaną BL) oraz trzech próbek kału uzyskanych od zdrowych ochotników (S1, S2, S3). Próbkę ATCC użyte w tym badaniu pochodzą z uwierzytelnionych społeczności drobnoustrojów wybranych na podstawie odpowiednich atrybutów fenotypowych i genotypowych, takich jak barwienie metodą Grama, zawartość GC, wielkość genomu i tworzenie zarodników, naśladując w ten sposób mieszane próbki metagenomiczne. Ponadto, ponieważ komórki gospodarza są również obfite w kale (Tortora i Anagnostakos 1987), do ATCC Bacterial Mix dodano około 10 000 ludzkich komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (P BMC), aby zbadać, czy podczas izolacji DNA istnieje preferencja w kierunku ludzkiego lub bakteryjnego DNA. Z kolei rzeczywiste próbki zostały wzbogacone o tzw. zymo-spikes w postaci dwóch szczepów bakterii (gram-dodatni *Allobacillus halotolerans* i gram-ujemny *Imtechella halotolerans*), które normalnie nie występują w ludzkich jelitach. Zymo-spikes zostały dodane w celu zbadania różnic w wydajności ekstrakcji DNA bakterii gram-ujemnych i gram-dodatnich ze względu na to, że różnice w budowie ściany komórkowej tych dwóch typów bakterii mogą potencjalnie powodować

znaczące odchylenia w procedurze izolacji DNA i późniejszych wynikach (Ketchum i in. 2018). Zarówno próbki BL jak i rzeczywiste próbki zostały następnie poddane homogenizacji przez trzy różne czasy: 10, 15 i 20 minut.

Na drugim etapie przetestowałam wpływ odczynników do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania NGS na uzyskiwane wyniki profilowania mikrobioty jelitowej. Do tego badania wybrano trzy zestawy odczynników wiodących producentów - KAPA, Illumina (Nextera) i Qiagen, które zostały wyselekcjonowane na podstawie ich popularności i różnic w procedurze fragmentacji DNA. Dodatkowo na tym etapie wprowadzona została nowa próbka, gotowy izolat ATCC Genomic Mix DNA (ATCC® MSA-1003™, zwany dalej GD), aby służyć jako referencyjna próbka, której przygotowanie nie wymaga izolacji DNA, dając trzy dodatkowe biblioteki (zwane dalej KAPA, Nextera i Qiagen). W sumie w ten sposób przygotowano 39 bibliotek - 13 bibliotek z każdym zestawem. Wszystkie biblioteki zostały następnie poddane sekwencjonowaniu NGS.

Jednocześnie przygotowano dwie próbki *in silico*, które zawierały mieszaną odczytów pochodzących z genomów bakterii stanowiących mieszaną bakterii ATCC (ISE i ISS). Jedną symulowaną próbkę odzwierciedlała skład bakterii w mieszaninie bakterii ATCC, podczas gdy dla drugiej skład był próbkowany z rozkładu logarytmiczno-normalnego. Te dwie symulowane próbki służyły jako kontrole do testowania narzędzi bioinformatycznych używanych do analizy składu społeczności. Na tym etapie użyto dwóch wiodących narzędzi do profilowania: MetaPhlAn2 (Truong i in. 2015) i kombinacji Kraken2/Bracken (Lu i in. 2017; Wood, Lu, i Langmead 2019). MetaPhlAn2 opiera się na mapowaniu predefiniowanych sekwencji markerów drobnoustrojów, podczas gdy Kraken opiera się na dopasowywaniu *k*-merów uzyskanych z odczytu sekwencjonowania z bazą danych *k*-merów pochodzących z bazy danych genomów drobnoustrojów.

Dodatkowo w celu zbadania zawartości ludzkiego DNA w zsekwencjonowanych próbkach odczyty uzyskane z próbek BL oraz rzeczywistych zostały zmapowane względem ludzkiego genomu (V. A. Schneider i in. 2017) za pomocą narzędzia BWA MEM (H. Li 2013). Podobnie, odczyty uzyskane z sekwencjonowania rzeczywistych próbek zostały zmapowane względem genomów referencyjnych gatunków użytych jako Zymo-spike, w celu porównania pokrycia odczytów mapujących do tych genomów i analizy stroniczości w izolacji gatunków gram-ujemnych i gram-dodatnich. Ponadto ocenie podlegał stosunek liczebności gatunków gram-dodatnich do gram-ujemnych w próbkach GD i BL w odniesieniu do oczekiwanych znanych proporcji tych typów bakterii w użytych w eksperymencie mieszanina ATCC.

Badania potwierdziły wpływ budowy komórki bakteryjnej (wyrażony przez status barwienia metodą Grama) na uzyskiwane liczebności poszczególnych gatunków bakterii. Wyniki uzyskane z próbek ludzkich z dodatkiem Zymo-spike oraz próbek BL wskazują, że przy rozważaniu wpływu homogenizacji na stroniczość izolacji bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych, może zadziałać kilka czynników. Podczas gdy liza ściany komórkowej bakterii gram-dodatnich może stanowić przeszkodę w izolacji DNA, kruchość bakterii gram-ujemnych może powodować mechaniczne fragmentowanie ich DNA. W zależności od tego, które z tych zjawisk przeważają, możemy zaobserwować albo zaniżoną reprezentację bakterii gram-dodatnich, albo gram-ujemnych. Uzyskane wyniki sugerują, że 10 minut homogenizacji najlepiej równoważy te dwa przeciwstawne czynniki, umożliwiając lepsze odzwierciedlenie liczebności bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych. Co więcej uzyskane w ten sposób profile mikrobiomu charakteryzują się najmniejszym stopniem heterogeniczności w zakresie różnorodności (*beta-diversity*) próbek.

Równocześnie, porównanie uzyskanych wyników wykazało, że zastosowany zestaw do przygotowania bibliotek NGS ma istotny wpływ na profilowanie mikrobiomu jelitowego. Zastosowanie zestawu Nextera opartego na tagmentacji pozwoliło uzyskać najbardziej jednolite i powtarzalne wyniki, co

stanowi kluczowy element każdego eksperymentu, także metagenomicznego. Dodatkowo, analiza bioinformatyczna ujawniła, że wybór narzędzia obliczeniowego do określania składu mikrobioty jelitowej ma istotne znaczenie dla uzyskiwanych wyników. W przeprowadzonych eksperymentach *in silico*, potok analityczny oparty na narzędziach Kraken2/Bracken przewyższał swoją skutecznością MetaPhlAn2. W szczególności przeprowadzone badania wykazały, że MetaPhlAn2 nie był w stanie wykryć wszystkich oczekiwanych gatunków, wykazując szczególnie niską skuteczność dla próbki ISS, która lepiej reprezentuje rozkład liczebności oczekiwany w rzeczywistych próbkach. Tandem Kraken2/Bracken był także w stanie zidentyfikować wszystkie oczekiwane gatunki dla próbek GD oraz BL przy równoczesnym zachowaniu na niskim poziomie fałszywych wyników (*false positive*), chociaż w obu przypadkach poszczególne liczebności odbiegały od rzeczywistych. Analiza poziomu odchyień od rzeczywistych wartości pozwoliła stwierdzić, że różnice w liczebnościach wynikają prawdopodobnie z błędu wprowadzonego na etapie izolacji materiału DNA z próbek BL.

Badanie wpływu zawartości ludzkiego DNA w izolowanym materiale na wyniki profilowania wykazało, że w niemal wszystkich testowanych próbkach liczba odczytów mapujących do genomu człowieka była mniejsza niż 3%. Ponadto test statystyczny wykazał, że zestawy wykorzystywane do przygotowania bibliotek odgrywały znaczącą rolę w kontekście frakcji odczytów mapowanych do ludzkiego genomu ($F=74,012$, $R^2=0,866$, $p=0,001$), w przeciwieństwie do czasu homogenizacji oraz kombinacji czasu homogenizacji i rodzaju zestawu do przygotowania bibliotek. Niezależnie od tego jednak, dalsza analiza bioinformatyczna wykazała, że zawartość ludzkiego DNA w próbkach nie wpływa znacząco na wyniki uzyskiwane w trakcie profilowania składu metagenomicznego próbek. Uzyskane profile metagenomiczne nie odbiegały od siebie w znaczący sposób, niezależnie od tego czy z danych odfiltrowano ludzkie odczyty czy też nie. Pozwoliło to na stwierdzenie, że często przeprowadzany w różnych protokołach analiz metagenomicznych krok odfiltrowywania odczytów pochodzących od gospodarza nie jest konieczny, aby uzyskać wiarygodne wyniki w zakresie profili metagenomicznych.

Przeprowadzone badania jednoznacznie potwierdziły, że projekt eksperymentu oraz protokół doświadczalny mogą mieć kluczowy wpływ na określenie profilu taksonomicznego mikrobiomu jelitowego. Odpowiadając na potrzebę standaryzacji metodologii przeprowadzania analiz metagenomicznych, wyniki moich badań pozwoliły na opracowanie rekomendacji w zakresie badań metagenomicznych w zakresie czasu homogenizacji (sugerowane 10 min), stosowanych odczynników do przygotowania bibliotek NGS (metody oparte na tagmentacji, Nextera, Illumina), narzędzi do profilowania składu taksonomicznego (przewaga programów Kraken2/Bracken) oraz braku konieczności odfiltrowywania odczytów pochodzących od człowieka. Tego typu badania i uzyskane wyniki są ważne dla szerokiego zakresu badań, których celem jest lepsze zrozumienie roli mikrobiomu jelitowego w zdrowiu i chorobie.

CZYNNIKI KSZTAŁTUJĄCE STRUKTURĘ MYKOBIOTY JELITOWEJ

Stosując opisaną powyżej zoptymalizowaną strategię, scharakteryzowałam mykobiotę jelitową u zdrowych ochotników, badając wpływ czynników demograficznych, diety oraz stylu życia na jej skład (**H2**). W badaniach skupiłam się na mykobiocie jelitowej, ponieważ jej rola w kontekście zdrowia i chorób pozostaje wciąż niedostatecznie poznana, a dostępne badania koncentrują się głównie na mikrobiocie bakteryjnej. Badania te przeprowadzone były w ramach projektu Mapa Mikrobiomu Polski (NCT04169867), który pozwolił na zebranie oraz analizę próbek kału od 923 zdrowych ochotników z Polski, co stanowi największą zbadaną do tej pory kohortę w kontekście mykobioty jelitowej. Tak liczna próba pozwoliła na dokładniejsze zidentyfikowanie potencjalnych zależności pomiędzy

czynnikami gospodarza a składem grzybów jelitowych, a także na uchwycenie zmienności międzysobniczej typowej dla wschodnioeuropejskiej populacji.

W 88,1% próbek (813 próbek) wykryłam obecność grzybów, identyfikując łącznie 55 gatunków należących do 37 rodzajów. Obecność grzybów w niemal 90% próbek potwierdziła tezę, że mykobiota jest powszechnym komponentem mikrobiomu jelitowego. Równocześnie badania potwierdziły niski udział mykobioty w całościowym mikrobiomie jelitowym – w przeanalizowanych przeze mnie próbkach mykobiota jelitowa stanowiła około 1% całej mikrobioty (Nash i in. 2017). W badaniu wykazałam także, że pomimo dużej zmienności międzysobniczej mykobioty, obecność kilku gatunków była stała i obserwowana w większości próbek, co dostarczyło argumentów za istnieniem bazowej mykobioty jelitowej. W tym kontekście w analizowanych próbkach najliczniej reprezentowanym typem był *Ascomycota* (94,0% próbek), natomiast *Basidiomycota* był obecny w 40,0% próbek. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi na stabilność *Ascomycetes* w ludzkim przewodzie pokarmowym (Richard i Sokol 2019; Shuai i in. 2022). Najczęściej wykrywanymi rodzajami były z kolei *Saccharomyces* (59,0% próbek), *Candida* (38,7% próbek) i *Sporisorium* (23,4% próbek), co może wskazywać na ich powszechną obecność w diecie lub środowisku, lub też specyficzne warunki sprzyjające ich kolonizacji. Częstość występowania gatunków należących do *Saccharomyces* i *Candida* w ludzkich jelitach jest zgodna z wcześniejszymi doniesieniami (Hoffmann i in. 2013), podczas gdy rodzaj *Sporisorium* nie został wcześniej opisany jako komponent ludzkiej mikrobioty jelitowej.

S. cerevisiae, *Candida albicans* i *Sporisorium graminicola* to gatunki, które znaleziono w największej liczbie próbek. Spośród nich, *S. cerevisiae* można powszechnie znaleźć w środowisku i żywności, co wskazuje na potencjalne źródła grzybów w ludzkich jelitach i odzwierciedla fakt, że środowisko i dieta mogą mieć nieodłączny wpływ na zdrowie ludzi. Z drugiej strony, *C. albicans*, który jest często wykrywanym grzybem w kale zdrowych ludzi, wydaje się nie mieć głównego rezerwuaru środowiskowego, co sugeruje, że współewoluował ze swoim gospodarzem i współistniejącymi drobnoustrojami (Pérez 2021). Warto zauważyć, że *S. graminicola*, który jest patogenem roślinnym, nie był wcześniej identyfikowany jako składnik ludzkiego jelita. Może to wynikać ze szczególnych nawyków żywieniowych badanej kohorty lub geograficznego występowania roślin, które są rezerwuarem *S. graminicola*.

Analiza wpływu czynników gospodarza na skład mykobioty jelitowej obejmowała łącznie 53 zmienne, takie jak dieta, wiek, płeć, stan zdrowia, styl życia oraz czynniki społeczno-ekonomiczne, pozwalając na kompleksowe ujęcie potencjalnych zależności. Wykazałam istotne powiązania między składem mykobioty a dziesięcioma czynnikami (Fig. 3A z publikacji H2), z których większość była związana z dietą – m.in. spożyciem chipsów, mięsa, napojów gazowanych, słodzików, przetworzonej żywności oraz alkoholu, w tym częstości jego spożycia, a także piwa. Ponadto także status cywilny oraz przedział wiekowy okazały się istotnymi czynnikami kształtującymi skład mykobioty. Z kolei stan zdrowia oraz przyjmowanie leków i suplementów nie miały istotnego wpływu na skład mykobioty, co sugeruje, że czynniki środowiskowe i dietetyczne odgrywają w tym przypadku kluczową rolę.

Badałam także korelacje pomiędzy występowaniem poszczególnych rodzajów grzybów, a obserwowanymi cechami. Analiza wykazała, że wiele rodzajów grzybów było powiązanych z różnymi czynnikami, z przewagą czynników związanych z chorobami i dietą, oraz że wzorce powiązań różniły się znacznie w zależności od konkretnego czynnika (Fig. 3C z publikacji H2). Przykładowo, rodzaje *Nakaseomyces*, *Neurospora* i *Sporisorium* były związane z depresją, co może wskazywać na ich rolę w procesach związanych z tym schorzeniem. Natomiast rodzaje *Aspergillus*, *Candida* i *Yarrowia* korelowały z zaburzeniami autoimmunologicznymi, sugerując ich potencjalny udział w reakcjach immunologicznych. W kontekście diety, rodzaj *Candida* był powiązany

z konsumpcją słodczy, soli, chipsów, kawy, ryb i warzyw, co może wskazywać, że jego występowanie może być silnie modulowane przez skład pożywienia. Rodzaj *Debaryomyces* wykazywał podobne zależności, szczególnie z solą, chipsami, kawą i herbatą. Inny potencjalnie istotny rodzaj grzybów, *Malassezia* korelował ze spożyciem ryb i herbaty, natomiast rodzaj *Yarrowia* był związana z konsumpcją chipsów. Te obserwacje sugerują, że różne rodzaje grzybów mogą reagować z lub pochodzić ze specyficznych produktów spożywczych.

W odniesieniu do diety, badania pokazały także, że wegetarianie mieli istotnie wyższą różnorodność grzybów jelitowych, zarówno biorąc pod uwagę wskaźnik bogactwa gatunkowego (ang. *alpha-diversity*) jak i różnorodności Shannona, co może sugerować, że dieta ta sprzyja obecności szerszej gamy grzybów, w tym tych pochodzących z roślin. Ponadto analiza różnicowa ujawniła wiele gatunków grzybów, które różnią się liczebnością u osób z określonym rodzajem diety. Częste spożycie alkoholu, w tym w szczególności wina, było związane z większą różnorodnością grzybów, przy czym spożycie alkoholu w ogólności wiązało się z wyższą obfitością *S. cerevisiae*, co może wynikać z roli alkoholu jako potencjalnego źródła egzogennej drożdży. Wyniki przeprowadzonych analiz potwierdziły, że dieta ma istotny wpływ na zmienność mykrobioty jelitowej, szczególnie w kontekście różnorodności gatunkowej oraz liczebności określonych rodzajów grzybów. Zjawisko to wydaje się mieć dwójaki charakter. Z jednej strony, spożywanie pokarmów zawierających grzyby, takich jak drożdże, może bezpośrednio wpływać na skład mykrobioty jelitowej, wprowadzając drożdże do przewodu pokarmowego (tak jak w przypadku wina). Z drugiej strony, składniki diety, takie jak cukry i alkohol, mogą sprzyjać rozwojowi określonych gatunków grzybów w jelitach.

W szczególności przeprowadzone badania potwierdzają wcześniejsze prace sugerujące, że dieta bogata w węglowodany sprzyja rozwojowi *Candida*, podczas gdy dieta wysokobiałkowa i tłuszczowa może ograniczać jej obecność (Hoffmann i in. 2013). Te wyniki są szczególnie istotne w kontekście zdrowia jelit i chorób związanych z dysbiozą mykrobioty, takich jak kandydoza czy choroby autoimmunologiczne. Nadmierna proliferacja grzybów z rodzaju *Candida* w jelitach może prowadzić do zaburzeń równowagi mikrobioty jelitowej, co ma szereg konsekwencji zdrowotnych, w tym wpływ na funkcjonowanie układu immunologicznego oraz rozwój stanów zapalnych. Przeprowadzone przeze mnie badania sugerują, że manipulowanie dietą, zwłaszcza ograniczenie węglowodanów prostych i zwiększenie spożycia białka i tłuszczu, może stanowić jedną z metod kontrolowania nadmiernego rozwoju grzybów z rodzaju *Candida*.

W odniesieniu do płci, różnice w składzie mikrobioty między mężczyznami i kobietami są dobrze udokumentowane, jednak jak dotąd badania koncentrowały się głównie na bakteriach (Kim i in. 2020; Valeri i Endres 2021), a niewiele uwagi poświęcono różnicom w składzie grzybów między płciami. Podobnie jak w przypadku bakterii, zróżnicowanie w składzie grzybów między płciami można by przypisać roli hormonów płciowych w modulowaniu składu mikrobioty (Markle i in. 2013) oraz pośrednio diety, która może być zależna od płci (Bolnick i in. 2014). Mimo tych założeń, w moich badaniach jedyną różnicą między płciami, którą zaobserwowałam, był poziom jednorodności mykrobioty jelitowej (wskaźnik Pilou), przy czym kobiety miały bardziej jednorodną mykrobiotę. Wydaje się zatem, że płeć nie ma istotnego wpływu na skład grzybów jelitowych.

W odróżnieniu od płci, przeprowadzone przeze mnie badania pokazały, że wiek jest związany ze składem mykrobioty jelitowej. Wcześniejsze prace dotyczące ludzkiej mykrobioty w zależności od wieku wykazały, że bogactwo mykrobioty jelitowej niemowląt (od 0 do 2 lat) i dzieci (od 3 do 10 lat) było wyższe niż dorosłych (18 lat) (Strati i in. 2016). Przeprowadzona przeze mnie analiza wykazała, że również w okresie dorosłości można zaobserwować zmiany w składzie grzybów jelitowych, gdyż osoby z grupy wiekowej 46-65 lat miały wyższą różnorodność mykrobioty niż badani z młodszych grup wiekowych (18-25 i 26-45). Przeprowadzone analizy pozwoliły także zidentyfikować wiele gatunków

grzybów różnicujących poszczególne grupy wiekowe, przy czym, największe różnice w gatunkach grzybów można było zaobserwować w porównaniu z osobami starszymi (grupa wiekowa 65+).

W kontekście parametru BMI, wyniki przeprowadzonych analiz pokazały, że osoby z nadwagą miały mniej jednorodną mykobiotę jelitową niż osoby z prawidłowym BMI i niedowagą, ponadto u osób otyłych stwierdzono zwiększoną liczebność *D. hansenii* i *Saccharomyces paradoxus*, które są drożdżami z rodziny *Saccharomycetaceae*. Wysoka liczebność *D. hansenii* może być związana z nawykami żywieniowymi osób z otyłością i nadwagą, ponieważ *D. hansenii* jest powszechnym gatunkiem we wszystkich rodzajach sera (Fleet 1990) i kiełbas (Dalton, Board, i Davenport 1984). Z drugiej strony, badania przeprowadzone na szczupłych i otyłych myszach sugerują, że mikrobiota jelitowa wpływa na bilans energetyczny, wpływając na efektywność pozyskiwania kalorii oraz sposób, w jaki ta energia jest wykorzystywana i przechowywana (Bäckhed i in. 2004; Turnbaugh i in. 2008; 2006). Grzyb jelitowy *Candida parapsilosis* został także niedawno zidentyfikowany jako krytyczny grzyb komensalny związany z otyłością wywołaną dietą u myszy (S. Sun i in. 2021). Uzyskane przeze mnie wyniki oraz odniesienia do innych badań w tym temacie pokazują, że mykobiota jelitowa może odgrywać kluczową rolę w rozwoju otyłości i związanych z nią zaburzeń metabolicznych.

W analizowanych przeze mnie przypadkach probiotyki miały istotny wpływ na mykobiotę jelitową – codzienne ich stosowanie wiązało się z niższą różnorodnością grzybów jelitowych i różnorodnymi zmianami w składzie poszczególnych gatunków w porównaniu do osób, które przyjmowały je sporadycznie lub wcale. W odróżnieniu od probiotyków, suplementy diety nie miały wyraźnego wpływu na mykobiotę jelitową. Także antybiotyki nie wpływały istotnie na ogólną różnorodność grzybów, jednak analiza składu gatunkowego wykazała pewne różnice w obfitości poszczególnych gatunków w zależności od schematu ich przyjmowania. Chociaż antybiotyki nie wpływają bezpośrednio na społeczność grzybów, to teoretycznie bakterie komensalne mogą ograniczać kolonizację i inwazję grzybów poprzez kilka mechanizmów, takich jak produkcja związków przeciwwgrzybiczych (Cabral i in. 2018), konkurencja o dostępne składniki odżywcze, chemotaksja i zmiany fizykochemiczne w środowisku lokalnym (Frey-Klett i in. 2011; Peleg, Hogan, i Mylonakis 2010). Dlatego też leki ukierunkowane na bakterie mogą być istotnym czynnikiem ryzyka infekcji grzybiczych. Z tego względu badania nad mykobiotą jelitową w kontekście antybiotyków są niezwykle istotne, ponieważ mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów równowagi mikrobiomu oraz sposobów minimalizowania ryzyka wystąpienia infekcji grzybiczych w wyniku stosowania terapii antybakteryjnych. Dodatkowo, badania te mogą pomóc w opracowaniu bardziej zrównoważonych strategii leczenia, które nie tylko skutecznie eliminują patogeny bakteryjne, ale również minimalizują negatywne efekty na inne składniki mikrobioty jelitowej, w tym grzyby.

Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w zrozumienie czynników kształtujących skład mykobioty jelitowej w populacji europejskiej. Wcześniejsze badania nad mykobiotą jelitową były prowadzone głównie w populacjach azjatyckich, a europejskie dane pozostawały ograniczone, co uniemożliwiało pełne zrozumienie wpływu czynników środowiskowych i demograficznych charakterystycznych dla tej części świata. Wielkość badanej kohorty, a także duża liczba analizowanych czynników pozwoliły na uchwycenie subtelnych zależności między czynnikami demograficznymi i środowiskowymi a składem mykobioty. Wyniki te dostarczają cennych informacji w kontekście roli mykobioty jelitowej w zdrowiu człowieka, wskazując na konieczność prowadzenia dalszych badań, które uwzględnią specyfikę regionalną i kulturową, w szczególności związaną z dietą regionalną. Mogą one również posłużyć jako punkt odniesienia do analizy mykobioty w przyszłych badaniach, umożliwiając bardziej precyzyjną identyfikację czynników wpływających na jej skład np. w konkretnych stanach chorobowych albo badanych warunkach. Praca powstała na bazie wykonanych analiz została w 2024 roku nominowana do Nagrody Dyrektora ICHB PAN za najlepszy artykuł eksperymentalny opublikowany w 2023 r.

DYSBIOZA MYKOBIOTY JELITOWEJ U PACJENTÓW Z CZERNIAKIEM ORAZ JEJ WPŁYW NA SKUTECZNOŚĆ IMMUNOTERAPII ANTY-PD-1

Znając zależności pomiędzy szeroką gamą czynników środowiskowych, dietetycznych oraz demograficznych w zdrowej kohorcie a składem mykrobioty jelitowej, postanowiłam przeanalizować rolę mykrobioty jelit w progresji czerniaka oraz odpowiedzi na terapię anty-PD-1 (**H3**). Immunoterapia, szczególnie inhibitory punktów kontrolnych, przyniosła przełom w leczeniu nowotworów, jednak jej skuteczność znacząco różni się między pacjentami – tylko 20-40% osiąga trwałą odpowiedź (Zhao, Zhao, i Zhao 2020). Moje zainteresowanie tym tematem wynikało z rosnącej liczby dowodów wskazujących na znaczenie mikrobiomu w modulacji odpowiedzi immunologicznej, przy jednoczesnym braku szczegółowych danych dotyczących specyficznej roli grzybów jelitowych w kontekście nowotworów immunogennych, takich jak czerniak. Moim celem było zbadanie, jak zmiany w składzie i różnorodności mykrobioty jelitowej mogą wpływać na rozwój tej choroby oraz skuteczność immunoterapii, co do tej pory pozostawało obszarem słabo rozpoznanym w literaturze naukowej dotyczącej czerniaka. Podejmując się tego zadania, dążyłam do wypełnienia istotnej luki w wiedzy, łącząc analizę mikrobiologiczną z klinicznymi aspektami onkologii, aby lepiej zrozumieć, w jaki sposób grzyby jelitowe mogą kształtować przebieg choroby i reakcję na leczenie.

W badaniu przeanalizowałam próbki kału od 86 pacjentów z czerniakiem oraz 134 zdrowych uczestników zrekrutowanych w ramach projektu Mapa Mikrobiomu Polaków. Zdrowi pacjenci byli podzbiorem z kohorty przeanalizowanej w mojej wcześniejszej pracy dotyczącej czynników kształtujących mykrobiotę jelitową w ogólności. Wśród pacjentów z czerniakiem wyróżnić można dwie grupy: 62 osoby z zaawansowanym czerniakiem w stadium III lub IV, leczone przeciwciałami anty-PD-1 (niwolumab lub pembrolizumab), oraz 24 pacjentów ze stabilnym klinicznie czerniakiem długoterminowym, otrzymujących szczepionkę terapeutyczną AGI-101H. W przypadku grupy anty-PD-1 (n=62) próbki pobierano w trzech punktach czasowych: przed rozpoczęciem terapii (BT), po 3 miesiącach leczenia (T3) oraz po 12 miesiącach leczenia (T12), co pozwoliło na ocenę dynamiki zmian mykrobioty jelitowej w trakcie immunoterapii. Natomiast od pacjentów otrzymujących szczepionkę AGI-101H (n=24) próbki zbierano w dwóch punktach: przed podaniem szczepionki oraz po 6-10 dniach od otrzymania szczepionki, aby ocenić stabilność mykrobioty w tej grupie. W przypadku pacjentów leczonych anty-PD-1, dodatkowo oceniano odpowiedź na terapię zgodnie z kryteriami RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors), klasyfikując ich reakcję jako pełną odpowiedź (CR – Complete Response), częściową odpowiedź (PR – Partial Response), stabilizację choroby (SD – Stable Disease) lub progresję choroby (PD – Progressive Disease). Pacjenci odpowiadający na leczenie (R) byli definiowani jako pacjenci z całkowitą (CR) lub częściową (PR) odpowiedzią na leczenie, podczas gdy pacjenci nieodpowiadający na leczenie (NR) byli definiowani jako pacjenci ze stabilną chorobą (SD) lub progresją (PD). W badaniu przeanalizowano 27 pacjentów z odpowiedzią R i 34 pacjentów z odpowiedzią NR. Dodatkowa, niezależna klasyfikacja dzieliła pacjentów na tych, którzy wykazywali korzyści kliniczne (CB) z terapii inhibitorami immunologicznego punktu kontrolnego (ICI) (CR, PR i SD) oraz tych, którzy nie wykazywali takich korzyści (NB, w tym PD). W badaniu przeanalizowano 37 pacjentów CB i 24 NB. Taki podział umożliwił mi analizę związku między składem mykrobioty a klinicznymi efektami leczenia.

Wykorzystując techniki sekwencjonowania NGS oraz analizy bioinformatyczne scharakteryzowałam strukturę mykrobiomu jelitowego u pacjentów z czerniakiem w porównaniu z grupą kontrolną. Moje badania ujawniły dysbiozę w mykrobiomie jelitowym pacjentów z czerniakiem w stosunku do zdrowych uczestników badania. Odkryłam, że u pacjentów występuje większa obfitość gatunków oportunistycznie patogennych takich jak *C. albicans*, *Candida dubliniensis* i *Neurospora crassa*, podczas gdy gatunki o potencjalnie korzystnym wpływie takie jak *S. cerevisiae* i *D. hansenii* były mniej liczne w porównaniu

z osobami zdrowymi. To nowe odkrycie wskazuje na specyficzny profil mykobiomu związany z czerniakiem, którego wcześniej nie opisano w literaturze. Co więcej, analizując próbki pobrane w trakcie terapii anty-PD-1 zaobserwowałam dynamiczne zmiany w składzie mykobioty jelitowej. Z potencjalnie bardziej istotnych zmian, zauważyć należy, że w trakcie immunoterapii wzrosła względna obfitość *Malassezia restricta* i *C. albicans*, co sugeruje, że leczenie immunologiczne może modulować mikrobiotę grzybową jelit. Chociaż dla *S. cerevisiae* nie zaobserwowano w tym ujęciu statystycznie istotnego efektu, to zauważyć należy, że liczebność tego gatunku grzyba stopniowo spadała w trakcie immunoterapii.

Kluczowym wynikiem moich badań jest wykazanie związku między składem mykobiomu a odpowiedzią na terapię anty-PD-1. Porównując pacjentów wykazujących kliniczne korzyści z terapii anty-PD-1 (CB) z pacjentami nie wykazującymi takich korzyści (NB), odkryłam, że pacjenci z grupy CB mieli niższe bogactwo grzybów jelitowych i różnorodność Shannona niż pacjenci z grupy NB, co może wskazywać na mniej zróżnicowane środowisko mykobioty sprzyjające skuteczności leczenia. Dodatkowo, gatunek grzyba *Tetrapisispora blattae* występował w mniejszej ilości u pacjentów, którzy skorzystali na leczeniu anty-PD-1, co sugeruje, że jego obecność może być związana z opornością na immunoterapię. Porównanie grup R vs. NR przyniosło podobne wyniki w zakresie całościowej struktury mykobioty jelitowej jak w przypadku porównania CB vs. NB (pacjenci z grupy R mieli niższe bogactwo grzybów i różnorodność Shannona niż NR). Analiza poszczególnych taksonów odróżniających R od NR wykazała wyższą liczebność *S. paradoxus* w grupie pacjentów pozytywnie odpowiadających na leczenie (R), co stanowi pierwszą wskazówkę, że ten gatunek może odgrywać ochronną rolę w kontekście immunoterapii, potencjalnie poprzez wspieranie korzystnej odpowiedzi immunologicznej.

Następnie postanowiłam sprawdzić, czy i jak poszczególne gatunki grzybów zidentyfikowanych w jelitach chorych na czerniaka korelują z progresją tej choroby. W tym celu wykonałam analizę przeżywalności (ang. *survival analysis*) metodą Kaplana-Meiera oraz użyłam modelu proporcjonalnego hazardu Coxa (CPH), uwzględniając w modelu również stężenie LDH jako biomarkera prognostycznego. W wyniku przeprowadzonych analiz wykazałam, że pacjenci z wysokim poziomem *M. restricta* mieli 2,2-krotnie większe ryzyko progresji czerniaka, natomiast u tych z wysokim poziomem *C. albicans* ryzyko było dwukrotnie wyższe w porównaniu do pacjentów z niskimi poziomami tego gatunku (Fig. 6A z publikacji H3). Analiza przeżycia wykazała, że większa liczebność *C. albicans* i *M. restricta* wiązała się z tendencją do krótszego przeżycia bez progresji ($p = 0,09$ i $p = 0,07$), choć wyniki nie osiągnęły pełnej istotności statystycznej (Fig. 6B z publikacji H3) – brak istotności statystycznej może być związany z ograniczoną liczebnością próby. Co więcej, mediana czasu progresji była znacząco krótsza u pacjentów z podwyższonym poziomem *M. restricta* (5 vs. 13 miesięcy) oraz *C. albicans* (3 vs. 14,5 miesiąca), co podkreśla potencjalne znaczenie tych gatunków grzybów jako predyktorów niekorzystnego przebiegu choroby u pacjentów leczonych terapią anty-PD-1.

Moje badania wniosły nową wiedzę do dziedziny onkologii, immunologii oraz mikrobiologii, wskazując, że mykobiota jelitowa odgrywa istotną, dotychczas niedocenianą rolę w progresji czerniaka i skuteczności immunoterapii. Otrzymane przeze mnie wyniki sugerują, że nie tylko bakterie, ale także grzyby jelitowe mogą aktywnie wpływać na odpowiedź immunologiczną organizmu na nowotwór, co wcześniej pomijano w badaniach nad mikrobiomem w kontekście czerniaka. Te odkrycia nie tylko poszerzają rozumienie mechanizmów leżących u podstaw tej choroby, ale także otwierają nowe możliwości kliniczne. Sugerują potencjalne biomarkery, takie jak *M. restricta*, *C. albicans* czy *S. paradoxus*, które mogą pomóc w przewidywaniu odpowiedzi na terapię, oraz strategie terapeutyczne oparte na modulacji mykobiomu, np. poprzez zastosowanie probiotyków zawierających grzyby z rodzaju *Saccharomyces*. Wyniki te mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad interakcjami między mykrobiomem a układem odpornościowym w kontekście immunoterapii nowotworów.

ANALIZA KORELACJI MIĘDZY MYKOBIOMEM A LIMFOCYTAMI U PACJENTÓW Z CZERNIAKIEM PODDAWANYCH TERAPII ANTY-PD-1

Kolejnym etapem moich prac było zbadanie związków pomiędzy składem mykobiomu jelitowego a różnymi populacjami limfocytów krążących we krwi u pacjentów z czerniakiem poddanych terapii anty-PD-1 (H4). W tym celu wykorzystałam dane z analiz cytometrii przepływowej uzyskane dla kohorty pacjentów włączonych do projektu Mapa Mikrobiomu Polski, integrując je z danymi taksonomicznymi pochodzącymi z sekwencjonowania NGS próbek kału tych pacjentów. Ponownie analizie poddawane były dane zebrane w trzech punktach czasowych: przed rozpoczęciem terapii (BT), po 3 miesiącach leczenia (T3) oraz po 12 miesiącach leczenia (T12), co pozwoliło na ocenę dynamiki zmian układu immunologicznego pacjentów w trakcie immunoterapii w kontekście składu mykobiomu jelitowego. Zastosowałam również podział pacjentów na grupy w zależności od odpowiedzi na terapię, co pozwoliło na śledzenie zmian w składzie mykrobioty jelitowej i profilu limfocytów w zależności od efektywności leczenia.

Przed analizą związków między mykobiomem jelitowym a limfocytami, zbadalam korelacje między populacjami limfocytów a cechami kohorty pacjentów, takimi jak wiek, poziom LDH w surowicy, ogólne przeżycie (OS) i przeżycie bez progresji (PFS). Wiek wybrałam ze względu na jego związek ze starzeniem układu odpornościowego, poziom LDH jako czynnik prognostyczny związany z odpowiedzią na terapię anty-PD-1, a OS i PFS ze względu na ich bezpośredni związek ze skutecznością immunoterapii. Dane sprzed leczenia (n=61) posłużyły do analizy korelacji między wybranymi czynnikami a poziomami limfocytów. Analiza korelacji wykazała liczne zależności (Tabela 2 w publikacji H4), w szczególności OS i poziom LDH korelowały z największą liczbą typów limfocytów. Większość korelacji była dodatnia, z wyjątkiem odwrotnych zależności dla LDH oraz PFS i OS, co jest uzasadnione, jako że wysoki poziom LDH jest wiązany z gorszą odpowiedzią na immunoterapię, a co za tym idzie, krótszym OS i PFS. Przykładowo wzrost LDH wiązał się ze spadkiem odsetka komórek B, podczas gdy dłuższe OS i PFS korelowały ze wzrostem tego odsetka. Podobnie, odwrotne relacje zaobserwowałam dla późnych pamięciowych komórek typu B: dodatnia korelacja z LDH, ujemna z OS i PFS. Dodatkowo pacjentów podzieliłam na grupy według progów dla wybranych parametrów (Tabela 3 w publikacji H4). Najwięcej zmian w poziomach limfocytów było związanych z OS i PFS. Podwyższone LDH wiązało się z wyższym odsetkiem późnych pamięciowych komórek typu B i limfocytów typu T CD273+/CD274+ oraz niższym odsetkiem komórek typu T. Odwrotne zmiany zaobserwować można było dla dłuższego OS.

Następnie przeanalizowałam zmiany w poziomach limfocytów u pacjentów poddanych terapii anty-PD-1, porównując poziomy przed rozpoczęciem leczenia oraz po trzech miesiącach terapii. Zaobserwowałam, że po trzech miesiącach leczenia poziomy przejściowych limfocytów B regulatorowych (ang. *B reg transitional*), naiwnych limfocytów typu B (ang. *Naive B cells non-memory*), a także limfocytów T PD-1-/CD152- były istotnie wyższe w porównaniu do wartości sprzed terapii (Tabela 4 z publikacji H4). Z kolei poziom limfocytów T PD-1+ był istotnie wyższy przed rozpoczęciem terapii niż po trzech miesiącach. Dalsze analizy wykazały, że większe różnice w poziomach limfocytów przed rozpoczęciem terapii obserwowano między pacjentami odnoszącymi kliniczne korzyści z terapii (CB) i nieodnoszącymi takich korzyści (NB) niż między pacjentami odpowiadającymi (R) i nieodpowiadającymi (NR) na terapię. Szczególnie interesujące było odwrócenie wzorca w przypadku późnych limfocytów B pamięci (ang. *Late memory B cells*). Przed terapią ich poziom był niższy w grupie R w porównaniu do NR, natomiast po trzech miesiącach leczenia poziom tych komórek był wyższy w grupie R. Wyniki te wskazują na dynamiczne zmiany w składzie populacji limfocytów podczas terapii anty-PD-1, które mogą mieć znaczenie dla oceny odpowiedzi na leczenie oraz prognozowania długoterminowych wyników terapii.

Znając wzorce zmian w zakresie analizowanych populacji limfocytów i ich zależności od czynników związanych ze skutecznością terapii oraz wiekiem i poziomem LDH, mogłam zająć się scharakteryzowaniem wzorów zależności pomiędzy mykobiotą jelitową a limfocytami pacjentów z czerniakiem w trakcie terapii anty-PD-1. Jednym z moich kluczowych osiągnięć było zidentyfikowanie specyficznych wzorców korelacji występowaniem grzybów jelitowych a poziomami różnych typów limfocytów, które zmieniały się w zależności od czasu terapii i odpowiedzi klinicznej. Szczególną uwagę zwróciłam na dwa gatunki grzybów – *M. restricta* i *C. albicans* – które w moich wcześniejszych badaniach [H3] wykazały korelacje ze zwiększonym ryzykiem progresji czerniaka i gorszą odpowiedzią na terapię anty-PD-1.

W niniejszej pracy wykazałam, że w grupie CB *M. restricta* wykazuje pozytywne korelacje z licznymi typami limfocytów, w tym z limfocytami B i T regulatorowymi oraz limfocytami T CD152+, a także negatywne z limfocytami T CD273-/274-. Analiza parowanego materiału (BT vs. T3) ujawniła, że w grupie NB zmiany w liczebności *M. restricta* wiązały się m.in. ze wzrostem limfocytów T PD-1+/CD152+, PD-1+ i T ogółem. Wyniki te mogą sugerować zróżnicowaną, związaną z odpowiedzią na leczenie, silną reakcję immunologiczną przeciwko antygenom lub metabolitom związanym z *M. restricta* u pacjentów z czerniakiem leczonych anty-PD1 lub nawet odpowiedź immunologiczną indukowaną przez *M. restricta*.

Z kolei *C. albicans* w grupie CB korelował pozytywnie z limfocytami związanymi z długoterminową odpornością, takimi jak limfocyty B pamięci CD27+, EM Th spośród limfocytów regulatorowych T, czy nieodróżniane limfocyty pamięci. W szczególności białko Tp55 kodowane przez gen CD27 jest członkiem nadrodziny receptorów TNF, wymagany do generowania i długotrwałego utrzymywania odporności komórek T. TNF, który może wykazywać zarówno działanie pro-, jak i przeciwnowotworowe w zależności od kontekstu (Gutierrez i in. 2022), jest zaangażowany nie tylko w kancerogenezę, ale także w niespecyficzną odporność na *C. albicans* (Richardson i Moyes 2015; Wang i Lin 2008). Ta zróżnicowana rola TNF podkreśla jego złożony udział w odpowiedziach immunologicznych. Co ciekawe, wykazano, że blokada TNF przewyższa oporność na terapię anty-PD-1 w czerniaku (Steinshamn i in. 1996), co wskazuje na potencjalny kontakt krzyżowy między sygnalizacją TNF a szlakami immunologicznych punktów kontrolnych. Ilość *C. albicans* w grupie CB korelowała również dodatnio z cytotoksycznymi limfocytami TD, sugerując aktywację przeciwgrzybiczej reakcji immunologicznej w tej grupie (Aybay i Imir 1996).

W grupie NB obserwowano odmienne wzorce dla *C. albicans*, m.in. pozytywne korelacje z podzbiorem limfocytów odpowiedzialnych za wczesną odpowiedź przeciwciał, plazmablastami i limfocytami pamięci późnej, a także z limfocytami T regulatorowymi. Odsetek limfocytów B pamięci późnej również ujemnie korelował z OS i PFS, a dodatkowo z poziomem LDH w surowicy i brakiem korzyści z leczenia anty-PD-1 w grupie BT, co sugeruje, że jest to marker gorszego rokowania w czerniaku. Co więcej, w grupie NB *C. albicans* ujemnie korelował z odsetkiem monocytów Mo CD273+ (PD-L2) i jednocześnie dodatnio z odsetkiem monocytów Mo CD274+ (PD-L1). Warto zauważyć, że analiza sparowanych próbek wykazała, że w grupie NB wzrost liczby *C. albicans* był skorelowany ze spadkiem ogólnej liczby komórek T, komórek T ekspresujących PD-1, PD-1 i CD 152, cytotoksycznych komórek T ekspresujących CD185 oraz monocytów ekspresujących CD273+/CD274+. Jednocześnie wzrost liczby *C. albicans* był związany w tej grupie ze wzrostem liczby monocytów ekspresujących CD273 i komórek T PD-1-/CD152-. Z literatury wiadomo, że PD-L1 negatywnie reguluje odporność przeciwgrzybiczą gospodarza na zakażenie *C. albicans* poprzez hamowanie uwalniania neutrofili ze szpiku kostnego (Y. Yu i in. 2022). Mechanizm obserwowany zarówno w mysich, jak i ludzkich neutrofilach obejmuje aktywację Dectin-1 przez grzybicze β -glukany, co z kolei indukuje ekspresję PD-L1. Zwiększony poziom PD-L1 kontroluje ruch neutrofili poprzez regulację samowydzielania chemokin CXCL1 i CXCL2. Regulacja ta utrudnia uwalnianie neutrofili ze szpiku kostnego do krwiobiegu,

zaosttrzając infekcję *C. albicans*. Różnice w odpowiedzi immunologicznej między NB i CB wskazują na potencjalny związek między odpowiedzią immunologiczną na infekcje grzybicze, takie jak *C. albicans*, a skutecznością strategii immunoterapeutycznych w leczeniu raka.

W odniesieniu do *S. cerevisiae*, u pacjentów z NB zaobserwowałam ujemną korelację z monocytami ekspresującymi PD-2L i dodatnią korelację z limfocytami CD4/CD8 ekspresującymi CD3. Co więcej, w grupie NB sparowana analiza wykazała dodatnią korelację między zmianą *S. cerevisiae* a limfocytami T CD273-/CD274- i ujemną z limfocytami T ekspresującymi PD-2L, PD-1L, a także CD4-/CD8-, niedojrzałymi aktywnymi komórkami B, plazmocytami spośród limfocytów B i późnymi limfocytami pamięci B. Wynik ten może sugerować, że u pacjentów nie wykazujących korzyści z leczenia anty-PD-1 (NB), spadek liczebności *S. cerevisiae* może być związany ze wzrostem PD-1L, PD-2L i limfocytów związanych z krótszym przeżyciem wolnym od progresji i całkowitym przeżyciem oraz wzrostem poziomu LDH w surowicy.

Inny interesujący gatunek grzyba o właściwościach przeciwutleniających i przeciwnowotworowych (Y. Yang i in. 2022), *D. hansenii*, wykazał w moich badaniach dodatnią korelację z monocytami ekspresującymi PD-1L i PD-2L u pacjentów z CB. W literaturze można znaleźć doniesienia, że doustne podawanie tych grzybów poprawiło wrodzoną odpowiedź immunologiczną u myszy, zwiększając ekspresję genów cytokin prozapalnych (INF- γ , IL-6 i IL-1 β) po prowokacji *E. coli* (Angulo i in. 2023). W innym modelu zwierzęcym, *D. hansenii* wykazała działanie immunostymulujące na leukocyty poprzez β -glukany (Angulo i in. 2019). W tym przypadku doustne podawanie *D. hansenii* CBS 8339 stymulowało odpowiedź immunologiczną, czynniki przeciwutleniające i geny szlaków sygnałowych związanych z odpornością w krótkim czasie. Odkrycia te sugerują, że *D. hansenii* jest obiecującym środkiem do dalszych badań nad zwiększeniem skuteczności immunoterapii.

Dotychczasowe badania nad mikrobiomem jelitowym w kontekście immunoterapii koncentrowały się głównie na bakteriach, pozostawiając rolę grzybów jelitowych w dużej mierze niezbadaną. Moja praca jako pierwsza dostarcza szczegółowych danych na temat korelacji między specyficznymi gatunkami grzybów jelitowych a subpopulacjami limfocytów w trakcie terapii anty-PD-1, wypełniając kluczową lukę w wiedzy dotyczącej wpływu mykobioty na odpowiedź immunologiczną w nowotworach. Zidentyfikowane wzorce wskazują, że zmiany w mykobiocie jelitowej mogą być związane z odpowiedzią immunologiczną na terapię anty-PD-1, co może mieć istotne znaczenie dla personalizacji leczenia. W szczególności, analiza różnic w reakcji immunologicznej między grupami CB i NB pozwoliła na zidentyfikowanie potencjalnych biomarkerów skuteczności terapii, takich jak specyficzne wzorce korelacji limfocytów z *M. restricta* i *C. albicans*. Ponadto, uwzględnienie dynamiki czasowej (BT vs. T3) umożliwiło zrozumienie, jak terapia anty-PD-1 wpływa na interakcje mykobioty z układem immunologicznym, co dotychczas nie było szeroko badane. Moje badania rzucają także światło na mechanizmy molekularne leżące u podstaw zróżnicowanej odpowiedzi na immunoterapię. Na przykład, wykazanie roli PD-L2 (CD273) i PD-L1 (CD274) w interakcjach między grzybami jelitowymi a limfocytami otwiera nowe pytania dotyczące konkurencji tych ligandów z przeciwciałami anty-PD-1, co może wyjaśniać oporność na leczenie u części pacjentów. Wyniki te są zgodne z literaturą wskazującą na silniejsze powinowactwo PD-L2 do receptora PD-1 w porównaniu do PD-L1 (Miao i in. 2021), co może utrudniać działanie terapeutyczne przeciwciał anty-PD-1.

PRZEGLĄD ROLI MYKOBIOMU W CHOROBYCH WĄTROBY

W pracy przeglądowej „*The emerging role of the gut mycobiome in liver diseases*” (H5) zebrałam oraz przeanalizowałam publikacje poświęcone roli mykobioty jelitowej w patogenezie chorób wątroby, podkreślając jego znaczenie w mechanizmach immunologicznych i metabolicznych. W pracy tej przeanalizowałam szereg schorzeń wątroby takich jak choroba wątroby związana z alkoholem (ALD),

niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (NAFLD), pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (PSC), marskość wątroby oraz rak wątrobowokomórkowy (HCC). Analiza dostępnego piśmiennictwa wykazała, że we wszystkich tych schorzeniach mykobiota jelitowa może odgrywać pewną rolę.

W badaniach poświęconym ALD, u myszy, którym podawano etanol zaobserwowano przerost grzybów jelitowych i wzrost poziomu β -glukanu we krwi, stwierdzono również, że podawanie leków przeciwgrzybiczych łagodziło objawy choroby wątroby związane z nadużywaniem etanolu (A.-M. Yang i in. 2017). Jako możliwe wytłumaczenie przedstawiono indukcję zapalenia wątroby poprzez β -glukan, aktywujący poprzez kaskadę sygnałową prozapalną cytokinę IL-1 β (Kankkunen i in. 2010). Z drugiej jednak strony, w innej pracy pokazano, że 1,3- β -glukan z *Wolfiporia cocos* działał ochronnie, zmniejszając stan zapalny i stłuszczenie wątroby (S. Sun i in. 2020). U pacjentów z zaburzeniem związanym ze spożywaniem alkoholu (AUD) oraz ALD zauważono wzrost poziomu wielu rodzajów i gatunków grzybów, w tym należących do rodzaju *Candida*, oraz w szczególności gatunku *C. albicans* (Chu i in. 2020; A.-M. Yang i in. 2017; Lang i in. 2020; Hartmann i in. 2021). Negatywny efekt wywołany przez *C. albicans* przypisano kandydalazynie wydzielanej przez ten gatunek grzyba, która to bezpośrednio powoduje śmierć hepatocytów i uszkodzenie wątroby.

W odniesieniu do NAFLD chociaż są pewne doniesienia na temat roli mykobioty jelitowej w tym schorzeniu, to większość badań koncentruje się na jej związku z otyłością, schorzeniu powiązanym z występowaniem NAFLD. W zgodzie z przeprowadzonymi przeze mnie wcześniej badaniami (H2), otyłe osoby charakteryzują się odmiennym składem mykobiomu jelitowego, m.in. podwyższoną zawartością grzybów z rodzaju *Candida*, *Nakaseomyces* i *Penicillium* (Hoffmann i in. 2013; Morales, Brignardello, i Gotteland 2010; Borges i in. 2018) oraz w ogólności podwyższoną zawartością grzybów należących do drożdży (Borges i in. 2018). Ponadto *Candida parapsilosis* została niedawno zidentyfikowana jako krytyczny grzyb komensalny związany z otyłością wywołaną dietą u myszy (S. Sun i in. 2021). Badanie związku składu grzybów jelitowych z parametrami antropometrycznymi i metabolicznymi związanymi z otyłością wykazało, że względna obfitość niektórych grzybów była powiązana z otyłością i związanymi z nią zaburzeniami metabolicznymi, w tym insulinoopornością, dyslipidemią, ciśnieniem krwi i aktywnością zapalną (Mar Rodríguez i in. 2015). Jednak nawet jeśli istnieją pewne powiązania między mykobiotą jelitową a otyłością, nadal nie jest jasne, czy zmiany w strukturze grzybów jelitowych przyczyniają się do rozwoju otyłości, czy są jedynie efektem różnych nawyków żywieniowych prowadzących do nadmiernej masy ciała, takich jak spożywanie dużej ilości węglowodanów lub tłuszczów.

W odniesieniu do samego NAFLD, wskazuje się, że efekt prozapalny związany z mykobiotą związaną z otyłością może być jedną z przyczyn nieszczelnej bariery jelitowej, co dodatkowo prowadzi do zapalenia wątroby. Literatura wymienia także rodzaje grzybów, których wyższe lub niższe poziomy obserwuje się w przypadku NAFLD oraz niealkoholowym stłuszczeniowym zapaleniu wątroby (NASH). Także w tym przypadku wśród gatunków grzybów potencjalnie powiązanych z NAFLD i cięższymi stadiami choroby wymienia się *C. albicans*, dla którego to zaobserwowano zwiększoną ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną (Demir i in. 2022). Co ciekawe, badania pokazują, że zmiany te można było zaobserwować szczególnie u pacjentów bez otyłości, podkreślając wcześniej niezgłaszane aspekty fenotypu NAFLD bez otyłości. Chociaż w jednym z badań na mysim modelu stłuszczeniowego zapalenia wątroby wywołanego dietą zachodnią, leczenie przeciwgrzybiczą amfoterycyną B zmniejszyło uszkodzenie wątroby, to jednak działanie to może wiązać się z jej wpływem na cholesterol i TLR, czynniki przyczyniające się bezpośrednio do NASH oraz zwłóknienia wątroby.

Badania nad PSC zwracają uwagę na hipotezę “nieszczelnego jelita”, ale także dysbiozę grzybową odgrywającą rolę w jej patogenezie. Odwołują się także do powiązania pomiędzy PSC oraz nieswoistym zapaleniem jelit (IBD), wskazując, że około 75% pacjentów z PSC ma również IBD (Loftus i in. 2005). Odkryto, że warianty CARD9, białka zaangażowanego we wrodzoną odporność przeciwko grzybom, zwiększają podatność na PSC i IBD (X. Li, Shen, i Ran 2017). Wysokie poziomy przeciwciał ASCA przeciwko *S. cerevisiae* są obecne u chorych na PSC (Muratori i in. 2003), natomiast obecność *Candida* w żółci wiąże się z gorszym rokowaniem (Rudolph i in. 2009). Efekt *Candida* może być związany z indukcją odpowiedzi Th17 (Katt i in. 2013), która może nasilać PSC, co potwierdzają podwyższone poziomy Th17 u pacjentów z tym schorzeniem (Nakamoto i in. 2019). Inne badania pokazują, że w PSC obserwuje się wzrost *Sordariomycetes* i *Exophiala* oraz spadek poziomu *S. cerevisiae* (Lemoine i in. 2020), który może działać ochronnie poprzez IL-10 (Sokol i in. 2017), podczas gdy *Exophiala dermatitidis*, gatunek grzyba należący do rodziny *Exophiala*, jest w stanie powodować infekcje imitujące PSC i uszkodzenie dróg żółciowych (K. H. Hong i in. 2009; Oztas i in. 2009). Stwierdzono także zwiększone proporcje grzybów do bakterii (ITS2/16S) i zaburzenia w sieci korelacji między tymi dwoma królestwami u pacjentów z PSC, co potwierdza zmiany w mykrobiomie, w tym wzrost *Candida* (Lemoine i in. 2020).

Badania wskazują także na potencjalną rolę mykrobioty jelitowej w marskości wątroby, będącym zaawansowanym etapem bliznowacenia wątroby wskutek przewlekłych uszkodzeń. Stosunek *Bacteroidetes/Ascomycota* zmienia się wraz z ciężkością choroby, a jego niższa wartość koreluje z mniejszą liczbą hospitalizacji i pozwala na przewidywanie 90-dniowej hospitalizacji niezależnie od innych czynników (Bajaj i in. 2018). Różnorodność grzybów spada u pacjentów z marskością i jest odwrotnie skorelowana z wynikiem modelu schyłkowej niewydolności wątroby (MELD). W szczególności *C. albicans* wykryto w około 20% próbek kału osób z marskością wątroby podczas leczenia rifaksymina (Zullo i in. 2012). Sytuacja wygląda inaczej w marskości związanej z HBV, w której to obserwuje się wzrost różnorodności i obfitości grzybów, m.in. *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*), *Aspergillus*, *Saccharomyces* (Mou i in. 2018; Cui, Morris, i Ghedin 2013; Guo i in. 2010; Chen i in. 2011). Według badań marskość zwiększa ryzyko kandydozy przełyku (Ou i in. 2014), choć związek przyczynowy pozostaje niejasny. Warto także nadmienić, że statystyki wskazują, że infekcje *Candida* i związana z tym kandydoza są poważnym zagrożeniem, z 55% śmiertelnością i 4,4-krotnie wyższym ryzykiem zgonu u pacjentów z marskością wątroby (Verma i in. 2022).

W odniesieniu do raka wątrobowokomórkowego (HCC), analiza dostępnego piśmiennictwa wskazuje na jego wieloczynnikową patogenezę, a wśród najważniejszych czynników ryzyka wyróżnia się zakażenie HBV, HCV oraz NASH (Chidambaramathan-Reghupaty, Fisher, i Sarkar 2021). Badania jednak wskazują, że mikrobiom jelitowy pacjentów z HCC różni się od osób zdrowych i może korelować z etiologią choroby (Ponziani i in. 2019; Ren i in. 2019). Szczególne znaczenie w patogenezie HCC ma aflatoksyna B1 (AFB1) (Kew 2013; Hamid i in. 2013), toksyczny metabolit produkowany przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, który może prowadzić do mutacji w genie supresorowym *Tp53* (Hussain i in. 2007; Bressac i in. 1991). Istnieją także przesłanki, że AFB1 w połączeniu z przewlekłym zakażeniem HBV znacząco zwiększa ryzyko nowotworzenia poprzez hamowanie mechanizmów naprawczych DNA oraz stymulację niekontrolowanej proliferacji komórek wątrobowych (Allen i in. 1992; Turner i in. 2000; Qian i in. 1994). Badania mykrobiomu u pacjentów z HCC wykazały również obniżoną różnorodność grzybów oraz zwiększoną obecność *C. albicans*, co sugeruje potencjalny związek z rozwojem nowotworu (Z. Liu i in. 2022). Ponadto, w surowicy pacjentów z HCC oraz w modelach zwierzęcych poddanych kolonizacji *C. albicans* wykazano wiele zmian w metabolizmie, w tym wzrost stężeń L-karnityny i L-acetylokarnityny (L. Zhou i in. 2012; Fujiwara i in. 2018). Ich rola w HCC pozostaje jednak niejednoznaczna – mogą one zarówno odzwierciedlać zwiększone zapotrzebowanie energetyczne komórek nowotworowych, jak i pełnić funkcję ochronną przed progresją

choroby (Ishikawa i in. 2014; Z. Liu i in. 2022). Dodatkowo, wykazano, że receptor NLRP6, regulujący odpowiedź immunologiczną na mikroorganizmy, jest kluczowy dla rozwoju HCC indukowanego przez *C. albicans* (Levy i in. 2015; R. Li i Zhu 2020). Odkrycie to może otworzyć nowe możliwości terapeutyczne poprzez celowanie w szlaki sygnalizacyjne związane z mykobiomem w leczeniu HCC.

Analizując prace związane z mykobiotą jelitową i chorobami wątroby przyjrzałam się także potencjalnie ochronnej roli grzybów jako probiotyków. Najszerzej opisywanym gatunkiem w literaturze okazał się *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Gatunek ten wykazuje korzystne działanie w leczeniu chorób przewodu pokarmowego, a także może modulować mikrobiom jelitowy oraz łagodzić uszkodzenia wątroby, stłuszczenie wątroby i przewlekły stan zapalny (L. Yu i in. 2017; Everard i in. 2014; Ansari i in. 2021). Jako probiotyk znajduje zastosowanie w prewencji i terapii NAFLD. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że jego doustna suplementacja prowadzi do zmniejszenia masy ciała, zawartości tłuszczu, stłuszczenia wątroby i stanu zapalnego (Everard i in. 2014). Ponadto *S. boulardii* wpływa na skład mikrobiomu jelitowego, redukując poziom *Escherichia coli* i *Bacteroides* u zwierząt z NAFLD (Y. T. Liu, Li, i Wang 2016). Podobne właściwości ochronne wykazują także makrogrzyby, takie jak *Agaricus bisporus* (Huang i in. 2016; Y. Liu i in. 2018; S. Li i in. 2017) i *Pleurotus ostreatus* (Duan i in. 2020), których polisacharydy zmniejszają stężenia ALT i AST w surowicy, ograniczają uszkodzenia hepatocytów, stan zapalny i stres oksydacyjny oraz poprawiają metabolizm lipidowy. W literaturze podkreśla się także, że stosowanie grzybowych probiotyków wymaga ostrożności, zwłaszcza u pacjentów z osłabioną odpornością. Istnieją doniesienia o przypadkach fungemii *S. cerevisiae* po jego zastosowaniu u osób z zapaleniem jelit wywołanym przez *Clostridium difficile* oraz u pacjentów neutropenicznych (Santino i in. 2014; Cesaro i in. 2000), co podkreśla konieczność dalszych badań nad bezpieczeństwem terapii mykobiotą.

POTENCJAŁ

Moje badania mają istotny potencjał zarówno w aspekcie naukowym, jak i klinicznym.

Po pierwsze, przyczyniają się do wprowadzenia nowych standardów badań metagenomicznych z kału (**H1**), co poprawia reprodukowalność wyników i umożliwia lepsze porównanie danych między różnymi badaniami. Standaryzacja protokołów badawczych w zakresie metagenomiki jest kluczowa dla zwiększenia wiarygodności uzyskiwanych wyników, zwłaszcza w kontekście analiz populacji mikroorganizmów innych niż bakterie, takich jak grzyby, które stanowią jedynie niewielki ułamek całego mikrobiomu, ale mogą mieć istotne znaczenie biologiczne. Brak jednolitych wytycznych w zakresie metod izolacji, sekwencjonowania i analizy danych prowadzi do trudności w interpretacji wyników oraz ich porównywalności między badaniami. Moje badania pozwalają na identyfikację kluczowych czynników wpływających na efektywność metodologii oraz na opracowanie rekomendacji dotyczących optymalnych strategii badawczych, co jest szczególnie istotne w zastosowaniach klinicznych, gdzie rzetelność i powtarzalność wyników mają bezpośredni wpływ na podejmowanie decyzji terapeutycznych.

Po drugie, badania te dostarczają dowodów na to, że chociaż grzyby zasiedlające jelito stanowią niewielką część mikrobioty jelitowej, mogą pełnić istotną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu oraz etiologii i progresji chorób, w tym nowotworowych (**H2, H3, H4**). Wyniki moich analiz wskazują, że mykobiota jelitowa nie jest jedynie biernym komponentem mikrobiomu, ale może aktywnie wpływać na odpowiedź immunologiczną gospodarza. W szczególności przeprowadzone badania nad rolą mykobioty jelitowej w modulacji odpowiedzi na terapię anty-PD-1 u pacjentów z czerniakiem ujawniają jej znaczący potencjał naukowy i kliniczny. Wykazałam, że obecność określonych gatunków grzybów, takich jak *M. restricta* i *C. albicans*, koreluje z niekorzystnym przebiegiem terapii anty-PD-1. Co istotne, prozapalna rola tych dwóch gatunków grzybów jest również obserwowana w innych

schorzeniach, takich jak alkoholowa choroba wątroby (ALD) i rak wątrobowokomórkowy (HCC) (**H5**), co sugeruje ich potencjalne zastosowanie jako uniwersalnych biomarkerów odpowiedzi immunologicznej.

Po trzecie, moje badania wskazują na potencjalne ochronne działanie niektórych gatunków grzybów, takich jak *S. cerevisiae* czy *D. hansenii*, które mogą wspierać korzystną odpowiedź immunologiczną i działać jako modulatory mikrobiomu (**H3**, **H4**, **H5**). Wyniki te otwierają perspektywę wykorzystania modulacji mykobioty jako strategii terapeutycznej, która mogłaby wspomagać skuteczność immunoterapii nowotworowej oraz innych terapii związanych z regulacją odpowiedzi immunologicznej. Koncepcja modulacji mikrobiomu jako wsparcia dla terapii onkologicznych zyskuje coraz większe znaczenie w kontekście medycyny precyzyjnej, a moje badania dostarczają nowych danych, które mogą pomóc w identyfikacji konkretnych interwencji ukierunkowanych na mykobiom.

Z perspektywy klinicznej, uzyskane wyniki mogą przyczynić się do optymalizacji terapii nowotworowych poprzez wprowadzenie nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych uwzględniających skład mykobioty jelitowej pacjenta. Zidentyfikowane korelacje pomiędzy określonymi gatunkami grzybów a populacjami limfocytów krążących we krwi wskazują na złożoną sieć interakcji pomiędzy mykobiotą jelitową a układem odpornościowym (**H4**). Podkreśla to potrzebę holistycznego podejścia do analizy mikrobiomu, obejmującego nie tylko bakterie, ale także grzyby i ich wpływ na skuteczność terapii immunoonkologicznych oraz innych schorzeń o podłożu immunologicznym i nie tylko. Wyniki przeglądu literaturowego w zakresie roli mykobioty jelitowej w chorobach wątroby (**H5**) wskazują, że jej wpływ na układ immunologiczny nie ogranicza się do nowotworów, ale może również odgrywać rolę w innych przewlekłych stanach zapalnych.

Ponadto moje badania wpisują się w szerszy kontekst medycyny precyzyjnej, podkreślając konieczność integracji danych mikrobiologicznych z klinicznymi w celu opracowania innowacyjnych metod diagnostycznych i terapeutycznych. Zastosowanie podejścia wielomodalnego, łączącego dane metagenomiczne, immunologiczne i kliniczne, może pozwolić na lepsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzi na leczenie oraz na rozwój bardziej spersonalizowanych strategii terapeutycznych, co jest kluczowym kierunkiem rozwoju współczesnej onkologii i immunologii.

OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Moje zainteresowania naukowe od początku koncentrowały się na wykorzystaniu narzędzi bioinformatycznych do analizy złożonych procesów biologicznych, a kolejne etapy mojej kariery naukowej umożliwiły mi rozwijanie tej ścieżki w coraz bardziej interdyscyplinarnych projektach badawczych. Moja praca łączyła aspekty teoretyczne i praktyczne – od rozwijania algorytmów i potoków analitycznych, po ich zastosowanie w badaniach biomedycznych – co pozwoliło mi zdobyć szerokie doświadczenie i przyczynić się do rozwoju nowoczesnych metod analizy danych biologicznych.

W przeszłości pracowałam nad stworzeniem metod komputerowych do analizy struktur cząsteczek RNA. W trakcie studiów magisterskich na Wydziale Biologii UAM, pod kierunkiem prof. Janusza Bujnickiego stworzyłam narzędzie o nazwie RNAm2D, umożliwiające wizualizację i analizę map kontaktów oraz odległości w cząsteczkach kwasów nukleinowych, a także ich kompleksach z białkami i ligandami. RNAm2D nie tylko generuje mapy kontaktów, ale także umożliwia przypisanie poszczególnych parowań zasadami do jednej z dwunastu rodzin parowań zasad oraz identyfikację interakcji typu stacking z rozróżnieniem przynależności do jednej z czterech klas oddziaływań. Przy użyciu RNAm2D możliwe jest także porównanie map kontaktów dla różnych struktur RNA, np. natywnej struktury vs. zmutowanej. Wyniki prac opublikowane zostały w pracy **N1**.

Rozwijając metody lepszego zrozumienia struktur i funkcji RNA, już na Wydziale Informatyki Politechniki Poznańskiej pod kierunkiem prof. Jacka Błażewicza, brałam udział w opracowaniu nowego podejścia do oceny struktur drugorzędowych RNA. Nowa metoda uwzględniała zarówno parowania kanoniczne, jak i niekanoniczne, klasyfikując je. Efektem prac było stworzenie podejścia, które opiera się na przewidywaniu struktury 3D RNA, na podstawie sekwencji lub struktury drugorzędowej, którą opisują tylko kanoniczne pary zasad, a następnie wyprowadzeniu rozszerzonej struktury drugorzędowej, zawierającej parowania niekanoniczne ze współrzędnych atomowych. Implementacja opracowanego podejścia udowodniła lepszą dokładność w ocenie niekanonicznych par zasad niż porównywane metody istniejące w tamtym czasie. Wyniki te opublikowano w pracy N3.

Moje badania nad strukturalnymi aspektami cząsteczek RNA obejmowały także współpracę z naukowcami z hiszpańskiego CIC bioGUNE i Uniwersytetu Luksemburskiego. Przy użyciu metod *in silico* zidentyfikowałam sygnał sekwencyjny i strukturalny na końcu 3'-UTR mRNA, kierujący cząsteczki mRNA do egzosomów. Wyniki moich analiz zostały potwierdzone eksperymentalnie, walidując zastosowane podejście bioinformatyczne. Prezentacja na ten temat została doceniona podczas konferencji Polskiego Towarzystwa Bioinformatycznego w 2014 roku, wygrywając konkurs na najlepszą prezentację ustną. Wyniki prac zostały także opublikowane (N2).

Tworzenie narzędzi i metod umożliwiających lepsze poznanie struktur cząsteczek biologicznych znacząco przyczynia się do zrozumienia biologicznej funkcji makrocząsteczek. W szczególności, opracowane metody mogą zostać wykorzystane do identyfikacji potencjalnych leków. Przeprowadzone przeze mnie badania zaowocowały publikacjami w trzech renomowanych czasopismach naukowych (N1-N3).

Następnie, podczas studiów doktoranckich, podjęłam tematykę związaną z hipotezą Świata RNA (N4-N7), którą kontynuowałam także po uzyskaniu stopnia doktora w ramach swoich prac na Politechnice Poznańskiej (N8, N9). Dokonałam konceptualizacji i rozwoju modelu systemu wieloagentowego, który pozwolił na przeprowadzenie symulacji reprezentujących zachowanie modelowych cząsteczek RNA (N6). Opracowany przeze mnie system wieloagentowy był pierwszym algorytmem pozwalającym na symulację złożonych systemów reakcyjno-dyfuzyjnych, uwzględniającym fizyczne aspekty modelowanych cząsteczek, takie jak kształt i rozmiar cząsteczek oraz ich gęstość upakowania obserwowaną w komórkach. Przeprowadzone eksperymenty obliczeniowe pozwoliły na postawienie tezy, że rozdzielenie funkcji na matrycę przechowującą informację genetyczną (DNA) i katalizator umożliwiający jej sprawne kopiowanie (białka polimerazy) było koniecznym krokiem ewolucyjnym, który pozwolił na powstanie bardziej złożonych systemów żywych. Co więcej, stworzona metodologia i algorytm mogą być wykorzystane do symulacji innych systemów biologicznych.

Przeprowadziłam także badania literaturowe związane z teorią hipercykli w świetle nowych badań eksperymentalnych, dokonując syntezy wiedzy w tym obszarze (N4). Powstały na ten bazie artykuł jest częścią inicjatywy *Topic Pages* w czasopiśmie *PLOS Computational Biology* (N7), której celem jest uzupełnianie braków w zasobach Wikipedii dotyczących biologii obliczeniowej oraz nagradzanie autorów za ich wkład merytoryczny. Artykuły z tej serii, poza tym, że są recenzowane publicznie, są następnie publikowane zarówno w czasopiśmie, jak i w wersji edytowalnej na Wikipedii. Dodatkowo mój artykuł został wyróżniony w sekcji "Did you know..." na stronie głównej Wikipedii, co znacznie zwiększyło jego zasięg – w ciągu jednego dnia odwiedziło go ponad 12 000 osób. Dzięki tej inicjatywie moja praca nad teorią hipercykli, ważnym zagadnieniem z pogranicza biologii i matematyki, zyskała szerokie grono odbiorców i przyczyniła się do stworzenia rzetelnego, dostępnego źródła wiedzy w Internecie.

Uczestniczyłam także w badaniach nad weryfikacją możliwości zbudowania obliczeniowej "sondy życia" do identyfikacji biologicznych sekwencji genetycznych (N8). Zaproponowane algorytmy

decyzyjne oparte na odległości kompresji i Levenshteina zostały zweryfikowane w kontekście hipotezy Świata RNA. Badania wykazały, że obie miary mogą być z powodzeniem stosowane do konstruowania sond życia, a jednocześnie różnią się od siebie pod względem wielu cech. Szczególnie zauważalne było, że fragmenty sekwencji związane z replikacją miały lepszą zdolność dyskryminacyjną niż sekwencje o innych funkcjach molekularnych.

Współpracując z fizykami z Uniwersytetu Toruńskiego, rozszerzyłam badania nad początkami życia o nowoczesne metody *ab initio* oparte na teorii kwantowej (N9). Symulacje dynamiki molekularnej metodą Car-Parrinello były wykorzystane do oceny roli zamknięcia prostych związków nieorganicznych i jonów w nanokompartamentach montmorylonitu (MMT). Badania wykazały, że obecność nanoglinki MMT istotnie zwiększała prawdopodobieństwo tworzenia nowych cząsteczek. Analiza funkcji rozkładu promieniowego atom-atom sugeruje, że obecność jonów Ca^{2+} w wnękach MMT może odgrywać ważną rolę w początkowych etapach tworzenia złożonych cząsteczek.

Przeprowadzone przeze mnie badania nad hipotezą Świata RNA poszerzyły wiedzę na temat abiogenezy i rozszerzyły nasze rozumienie życia. Badania te zaowocowały sześcioma publikacjami w renomowanych czasopismach naukowych (N4-N9) oraz pracą doktorską, która otrzymała wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Bioinformatycznego w kategorii najlepszej pracy doktorskiej z bioinformatyki w 2018 roku. Ponadto na realizowane badania otrzymałam grant Etiuda NCN, który pozwolił mi na odbycie stażu na Uniwersytecie Luksemburskim. Przeprowadzone przeze mnie badania doceniła także Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej, przyznając mi w 2019 r. stypendium START przyznawane corocznie 100 najwybitniejszym młodym naukowcom.

W ramach współpracy z fizykami, chemikami, biologami i lekarzami, zaangażowana byłam dodatkowo w kilka projektów badawczych o interdyscyplinarnym charakterze, w których służyłam wiedzą i doświadczeniem w wyborze metod analitycznych, projektowaniu bioinformatycznych potoków obliczeniowych i interpretacji wyników analiz. Przykładowo, we współpracy z grupą z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, analizowaliśmy dwa warianty polimorfizmu miR-125a w kontekście raka piersi. Nasze badanie wykazało, że badane warianty mogą promować różne wzory zwijania się RNA, powodując alternatywne wiązanie białek i niższą ekspresję miR-125a w raku piersi (N11). W ramach innej współpracy wewnętrznej, uczestniczyłam w projekcie badającym genetyczne aspekty raka podstawnokomórkowego. Przeprowadzone analizy na podstawie opracowanego potoku obliczeniowego, pozwoliły stwierdzić liczne alteracje w ramach regionów niekodujących genów, co może przyczynić się do diagnostyki i badań nad nowymi terapiami raka (N12). Ponadto opracowałam nowatorski protokół bioinformatyczny oraz potoki obliczeniowe pozwalające na analizę końców 3'UTR na podstawie wyników sekwencjonowania wysokoprzepustowego. Umożliwiło to badanie znaczenia dynamiki nie matrycowych końców 3' retrotranspozonów L1 i wzajemnego oddziaływania między końcami 3' i 5' L1 (N13). Praca powstała na bazie wykonanych analiz została w 2025 roku nominowana do Nagrody Dyrektora ICHB PAN za najlepszy artykuł eksperymentalny opublikowany w 2024 r. Byłam także pomysłodawcą oraz pełniłam nadzór nad pracami mającymi na celu usystematyzowanie wiedzy w obszarze rozwoju rozwiązań do przewidywania struktury RNA opartych na uczeniu maszynowym, w szczególności zorientowanych na ostatnie postępy w dziedzinie głębokiego uczenia (DL). Na skutek tych działań pod moim kierunkiem powstała praca przeglądowa N14.

Brałam także udział w kilku projektach: “Regional COVID-Hub”, “ECBiG – Europejskie Centrum Bioinformatyki i Genomiki – MOSAIC” oraz “Genomiczna Mapa Polski” (GMP) w ramach “ECBiG – Europejskie Centrum Bioinformatyki i Genomiki”. W ramach projektu MOSAIC byłam odpowiedzialna za rozwój metod integracji i analizy wielowymiarowych danych biomedycznych, testowanie i walidację tworzonych rozwiązań. W “Regional COVID-Hub” pracowałam nad implementacją narzędzi bioinformatycznych do przetwarzania i analizy danych epidemicznych oraz wdrożeniem metod

wizualizacji danych. Z kolei w projekcie GMP uczestniczyłam w pracach grupy rozwijającej narzędzia bioinformatyczne do wielkoskalowej analizy genomów, w szczególności moje działania skupiały się na retrotranspozonach.

W kontekście współpracy zewnętrznej, pełniłam rolę kierownika w dwóch projektach badawczo-rozwojowych finansowanych przez fundusze BRIDGE Alfa dotyczących wykorzystania sztucznej inteligencji w diagnostyce schorzeń oczu. Opracowane algorytmy umożliwiają identyfikację chorób na podstawie analizy obrazów, wspierając proces diagnozy. Badania te przyczyniają się do postępu w zastosowaniu zaawansowanych technologii, takich jak sztuczna inteligencja, w obszarze medycyny, poprawiając skuteczność diagnozy i wspierając opiekę zdrowotną.

INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

Swoją działalność naukową realizowałam w trzech jednostkach:

A. Przed uzyskaniem stopnia doktora

- Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (2008-2010): **N1** – praca w ramach studiów magisterskich na Wydziale Biologii.
- Politechnika Poznańska (2012-2018): **N2-N7** – prace w ramach studiów doktoranckich na Wydziale Informatyki PP.
- Instytut Chemii Bioorganicznej PAN (2016-2020): **N5-N7** – prace na stanowisku asystenta w Zakładzie Bioinformatyki Strukturalnej ICHB PAN.

B. Po uzyskaniu stopnia doktora

- Politechnika Poznańska (2018): **N8-N11** – prace na stanowisku starszego specjalisty ds. naukowo-technicznych w Instytucie Informatyki Politechniki Poznańskiej.
- Instytut Chemii Bioorganicznej PAN (2020-obecnie): **H1-H5, N12-N14** – prace na stanowisku adiunkta w Pracowni Bioinformatyki.

W trakcie mojej pracy naukowej miałam także okazję realizować projekty w ramach krajowych i międzynarodowych współprac.

Przed zdobyciem stopnia doktora:

- Współpracowałam z prof. Antonio del Sol z Uniwersytetu Luksemburskiego oraz prof. Juanem Manuelem Falconem-Perezem z Center for Cooperative Research in Biosciences (CIC bioGUNE) w Hiszpanii. Współpraca ta dotyczyła badania mechanizmów sortowania mRNA do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) w systemach komórkowych wątrobowy. Mój wkład polegał na zastosowaniu narzędzi bioinformatycznych do identyfikacji nowej sekwencji o długości 12 nukleotydów, która była znacząco wzbogacona w mRNA akumulujących się w EVs. Przeprowadzone przez hiszpańskiego partnera eksperymenty z użyciem reportera lucyferazy, który zawierał sekwencję 3'-UTR z tym motywem, pozwoliły potwierdzić, że sekwencja ta wspiera włączanie mRNA do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w modelu komórkowym wątrobowy. Wyniki naszych badań wniosły istotny wkład w zrozumienie

mechanizmów sortowania mRNA w procesach komunikacji międzykomórkowej. Zaowocowały także jedną publikacją naukową (N2).

Po uzyskaniu stopnia doktora:

- Od 2024 r. współpracuję z dr hab. Bartłomiejem Budnym z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz z Wielkopolskim Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii. W ramach tej współpracy jestem odpowiedzialna za analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania próbek pochodzących od pacjentów z nowotworami płuc oraz wsparcie w identyfikacji nowych czynników genetycznych zachorowania na te nowotwory, będące także potencjalnie nowymi celami terapeutycznymi. Prace te znajdują się obecnie w toku.
- Od 2022 r. współpracuję stale z prof. Andrzejem Mackiewiczem i prof. Mariuszem Kaczmarkiem z Wydziału Immunologii Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz Wydziału Diagnostyki i Immunologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii, a także z prof. Jackiem Mackiewiczem z Instytutu Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W wyniku tej współpracy powstały dotychczas dwie publikacje (H3 i H4), w których przeanalizowałam skład mykrobioty jelitowej pacjentów w zaawansowanym stadium czerniaka i skorelowałam go z odpowiedzią immunologiczną na immunoterapię.
- Od 2020 r. współpracuję z prof. Marcinem Schmidtem z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Współpraca ta zaowocowała dotychczas czterema publikacjami (H1-H4), w których podjęty został szereg tematów związanych z badaniami nad mikrobiotą jelitową. M.in. standaryzacja procedury profilowania mikrobioty jelitowej, analiza mykrobioty jelitowej polskiej populacji, jej związków z czynnikami takimi jak dieta i styl życia, a także różnic pomiędzy mikrobiotą jelitową zdrowych osób a pacjentów chorych na czerniaka.
- Współpracowałam z prof. Wiesławem Nowakiem z Instytutu Fizyki Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Uniwersytetu im. M. Kopernika w Toruniu. Współpraca ta dotyczyła badań nad katalitycznymi właściwościami minerałów, takich jak montmorylonit (MMT), w kontekście potencjalnych procesów prowadzących do powstania związków prekursorowych kwasów nukleinowych lub aminokwasów w warunkach przypominających tzw. pierwotną zupę prebiotyczną. Mój wkład polegał na krytycznej analizie uzyskiwanych wyników symulacji *ab initio* metodą Car–Parrinello, szczególnie pod kątem reaktywności składników gazowych oraz wpływu lokalnych pól elektrycznych i obecności jonów Ca^{2+} na formowanie się nowych cząsteczek w warunkach nanokonfinencji. Na skutek tej współpracy powstała jedna publikacja naukowa (N9).
- Współpracowałam z dr Tomaszem Lehmanem i prof. Pawłem Jagodzińskim z Wydziału Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Współpraca ta dotyczyła badania polimorfizmu rs12976445 w kontekście nowotworu piersi oraz jego potencjalnego wpływu na ekspresję miR-125a, istotnego biomarkera różnych typów nowotworów. Mój wkład polegał na analizie danych klinicznych 175 próbek krwi pacjentek z rakiem piersi w porównaniu z 129 próbkami kontrolnymi, a także interpretacji wyników modelowania *in silico*, które wykazały, że obecność urydyny (U) w sekwencji pri-miR-125a może zmniejszać prawdopodobieństwo wiązania z białkami NOVA1 i HNRNPK. Wykazałam również, że warianty U i C mogą wpływać na alternatywne fałdowanie RNA oraz różnicować wiązanie białek, co może prowadzić do obniżonej ekspresji miR-125a w przypadkach nowotworu piersi. Na skutek tej współpracy powstała jedna publikacja naukowa (N11).

Podczas mojej kariery naukowej, przed zdobyciem stopnia doktora, odbyłam następujące staże w innych instytucjach naukowych.

Po ukończeniu studiów magisterskich na wydziale Biologii UAM:

- Od 11.2016 do 02.2017 roku w ramach stypendium Etiuda, odbyłam trzymiesięczny staż na Uniwersytecie Luksemburskim, którego opiekunem naukowym był prof. Pascal Bouvry. Podczas stażu zapoznałam się z systemami obliczeń rozproszonych wielkiej mocy (HCP), którą to wiedzę wykorzystuję obecnie w swojej codziennej działalności naukowej analizując duże wolumeny danych multiomicznych.
- W 2012 r. dostałam się na studia doktoranckie na Wydziale Informatyki Politechniki Poznańskiej, gdzie następnie realizowałam doktorat pod opieką prof. dr hab. inż. Jacka Błazewicza. W 2018 roku obroniłam z wyróżnieniem pracę doktorską. Na skutek prac nad doktoratem powstał szereg prac naukowych (N4-N9). W trakcie studiów doktoranckich w latach 2016-2017 byłam także wykonawcą w projekcie OPUS “RNApolis – metody i algorytmy do modelowania i analizy struktury RNA”, a w latach 2012-2015 byłam wykonawcą projektu OPUS “Informatyczne modele i metody w biologii komórkowej”. Działania te skutkowały trzema pracami naukowymi (N3, N9, N11).

Podczas studiów magisterskich na wydziale Biologii UAM:

- Pierwszy semestr III rok studiów magisterskich spędziłam na wymianie w ramach programu Sokrates-Erasmus na Uniwersytecie Mediolańskim we Włoszech. Podczas tego stypendium miałam okazję odbyć staż w Laboratorium Bioinformatyki, Ewolucjonizmu i Genomiki Porównawczej. Opiekunem stażu był prof. Giulio Pavesi. Podczas stażu uczestniczyłam w projekcie, którego tematem była analiza regionów genomu regulujących transkrypcję genów w celu scharakteryzowania i predykcji ekspresji genów. Zajmowałam się identyfikacją miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych (TFBS) oraz klastrowaniem metodami nadzorowanymi i nienadzorowanymi. Dzięki pobytowi w Laboratorium prof. Pavesi zdobyłam podstawową wiedzę o biologii obliczeniowej i narzędziach bioinformatycznych. Pozwoliło mi to także zdecydować, że kierunkiem mojego dalszego rozwoju naukowego będzie bioinformatyka.

INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ.

OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE

Po uzyskaniu stopnia doktora:

- Przygotowałam oraz przeprowadziłam wykłady dla Uniwersytetu Medycznego w Lublinie na kursie “Podstawy Bioinformatyki” dla specjalizacji laboratoryjna genetyka medyczna. (02.2025)
- Do tej pory pod moją opieką znajdowało się dwóch doktorantów:
 - p. Michał Budnik w ramach doktoratu wdrożeniowego realizowanego na Wydziale Informatyki Politechniki Poznańskiej we współpracy z prywatnym podmiotem gospodarczym (N1).
 - p. Maciej Michalczyk, realizujący doktorat u dr hab. Anny Philips, prof. ICHB PAN, w realizowanym przez nią grantie OPUS mającym na celu zbadanie związku pomiędzy różnymi frakcjami pyłów znajdujących się w powietrzu a składem mikroorganizmów znajdującym się w nim.

- Byłam recenzentką pracy magisterskiej pt. *“Analiza i identyfikacja domen białkowych o wysokim stopniu zróżnicowania sekwencji”*, kierunek Bioinformatyka, PP/UAM, 2018.
- Opiekowałam się stażystką w ramach wymiany Erasmus.

Podczas doktoratu:

- Opiekowałam się dwiema pracami magisterskimi:
 - p. Jarosław Synak, temat pracy: *“Metody wydajnego symulowania systemów wieloagentowych zaprojektowanych na bazie automatów komórkowych”*, PP, kierunek Informatyka, 2018.
 - p. Amadeusz Juskowiak, temat pracy: *“Solving quadratic assignment problem using algorithm inspired by Physarum polycephalum”* PP, kierunek Informatyka, 2016.

Za szczególne osiągnięcie dydaktyczne uważam fakt, że pan Jarosław Synak po obronie pracy dyplomowej, zdecydował się kontynuować naukę na studiach doktoranckich.

- Opiekowałam się dwiema pracami licencyjnymi/inżynierskimi.

OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE

- W czasie studiów doktoranckich byłam przewodniczącą samorządu doktoranckiego Wydziału Informatyki i reprezentantką doktorantów w Radzie Wydziału Informatyki.
- Organizacja pikniku historycznego *“Śniadanie u Generała”* w Pałacu w Turwi należącym do ICHB PAN

OPRÓCZ KWESTII WYMIENIONYCH W PKT. 1-6, WNIOSKODAWCA MOŻE PODAĆ INNE INFORMACJE, WAŻNE Z JEGO PUNKTU WIDZENIA, DOTYCZĄCE JEGO KARIERY ZAWODOWEJ.

NAGRODY, WYRÓŻNIENIA I STYPENDIA

- Nominacja do nagrody Dyrektora ICHB PAN za najlepszą publikację eksperymentalną opublikowaną w 2024 (**N13**), 2025.
- Nominacja do nagrody Dyrektora ICHB PAN za najlepszą publikację eksperymentalną opublikowaną w 2023 (**H2**), 2024.
- Stypendium START FNP dla 100 najwybitniejszych młodych naukowców, 2019.
- Wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Bioinformatycznego w konkursie na najlepszą pracę doktorską obronioną w 2018.
- Obrona pracy doktorskiej z wyróżnieniem, 2018.
- Stypendium Etiuda (NCN) *“Bioinformatyczne metody modelowania i weryfikacji hipotezy Świata RNA”* (2016/20/T/ST6/00395), 2016.
- Najlepsza prezentacja ustna na Konferencji Polskiego Towarzystwa Bioinformatycznego (PTBI), 2014.
- Stypendium dla najlepszych doktorantów PP, lata 2013-2018.
- Stypendium naukowe Wydziału Informatyki PP (studia doktoranckie), lata 2012-2018.
- Nagroda absolutoryjna Dziekana Wydziału Biologii UAM za bardzo dobre wyniki w nauce, 2008.

- Stypendium naukowe Wydziału Biologii UAM (studia licencjackie i magisterskie), lata 2006-2010.

REFERENCJE

- Allen, S. J., C. P. Wild, J. G. Wheeler, E. M. Riley, R. Montesano, S. Bennett, H. C. Whittle, A. J. Hall, i B. M. Greenwood. 1992. „Aflatoxin Exposure, Malaria and Hepatitis B Infection in Rural Gambian Children”. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86 (4): 426–30. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(92\)90253-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90253-9).
- Angulo, Miriam, Abel Ramos, Martha Reyes-Becerril, Kevyn Guerra, Elizabeth Monreal-Escalante, i Carlos Angulo. 2023. „Probiotic *Debaryomyces Hansenii* CBS 8339 Yeast Enhanced Immune Responses in Mice”. *3 Biotech* 13 (1): 28. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03442-6>.
- Angulo, Miriam, Martha Reyes-Becerril, Ramón Cepeda-Palacios, Dariel Tovar-Ramírez, María Ángeles Esteban, i Carlos Angulo. 2019. „Probiotic Effects of Marine *Debaryomyces Hansenii* CBS 8339 on Innate Immune and Antioxidant Parameters in Newborn Goats”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (5): 2339–52. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09621-5>.
- Ansari, Fereshteh, Shohre Alian Samakkhah, Ali Bahadori, Seyedeh Maedeh Jafari, Mojtaba Ziaee, Mohammad Taghi Khodayari, i Hadi Pourjafar. 2021. „Health-promoting properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 0 (0): 1–29. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1949577>.
- Aybay, Cemalettin, i Turgut Imir. 1996. „Tumor Necrosis Factor (TNF) Induction from Monocyte/Macrophages by *Candida Species*”. *Immunobiology* 196 (4): 363–74. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(96\)80059-3](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(96)80059-3).
- Aykut, Berk, Smruti Pushalkar, Ruonan Chen, Qianhao Li, Raquel Abengozar, Jacqueline I. Kim, Sorin A. Shadaloey, i in. 2019. „The Fungal Mycobiome Promotes Pancreatic Oncogenesis via Activation of MBL”. *Nature* 574 (7777): 264–67. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1608-2>.
- Bäckhed, Fredrik, Hao Ding, Ting Wang, Lora V. Hooper, Gou Young Koh, Andras Nagy, Clay F. Semenkovich, i Jeffrey I. Gordon. 2004. „The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (44): 15718–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>.
- Bajaj, Jasmohan S., Eric J. Liu, Raffi Kheradman, Andrew Fagan, Douglas M. Heuman, Melanie White, Edith A. Gavis, Phillip Hylemon, Masoumeh Sikaroodi, i Patrick M. Gillevet. 2018. „Fungal Dysbiosis in Cirrhosis”. *Gut* 67 (6): 1146–54. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313170>.
- Bao, Li, Ying Zhang, Guoying Zhang, Dechun Jiang, i Dan Yan. 2023. „Abnormal Proliferation of Gut Mycobiota Contributes to the Aggravation of Type 2 Diabetes”. *Communications Biology* 6 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04591-x>.
- Ben-Ami, Ronen, Russell E. Lewis, i Dimitrios P. Kontoyiannis. 2010. „Enemy of the (Immunosuppressed) State: An Update on the Pathogenesis of *Aspergillus Fumigatus* Infection”. *British Journal of Haematology* 150 (4): 406–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08283.x>.
- Bolnick, Daniel I., Lisa K. Snowberg, Philipp E. Hirsch, Christian L. Lauber, Elin Org, Brian Parks, Aldons J. Lusi, Rob Knight, J. Gregory Caporaso, i Richard Svanbäck. 2014. „Individual Diet Has Sex-Dependent Effects on Vertebrate Gut Microbiota”. *Nature Communications* 5 (lipiec):4500. <https://doi.org/10.1038/ncomms5500>.
- Borges, Francis M., Thaís O. de Paula, Marjorie R. A. Sarmiento, Maycon G. de Oliveira, Maria L. M. Pereira, Isabela V. Toledo, Thiago C. Nascimento, Alessandra B. Ferreira-Machado, Vânia L. Silva, i Cláudio G. Diniz. 2018. „Fungal Diversity of Human Gut Microbiota Among Eutrophic,

- Overweight, and Obese Individuals Based on Aerobic Culture-Dependent Approach". *Current Microbiology* 75 (6): 726–35. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1438-8>.
- Bressac, B., M. Kew, J. Wands, i M. Ozturk. 1991. „Selective G to T Mutations of P53 Gene in Hepatocellular Carcinoma from Southern Africa". *Nature* 350 (6317): 429–31. <https://doi.org/10.1038/350429a0>.
- Briard, Benoit, Thierry Fontaine, Thirumala-Devi Kanneganti, Neil A.R. Gow, i Nicolas Papon. 2021. „Fungal cell wall components modulate our immune system". *The Cell Surface* 7 (listopad):100067. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2021.100067>.
- Cabral, Damien J., Swathi Penumutchu, Colby Norris, Jose Ruben Morones-Ramirez, i Peter Belenky. 2018. „Microbial Competition between *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* Reveals a Soluble Fungicidal Factor". *Microbial Cell* 5 (5): 249–55. <https://doi.org/10.15698/mic2018.05.631>.
- Cesaro, S., P. Chinello, L. Rossi, i L. Zanesco. 2000. „*Saccharomyces Cerevisiae* Fungemia in a Neutropenic Patient Treated with *Saccharomyces Boulardii*". *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 8 (6): 504–5. <https://doi.org/10.1007/s005200000123>.
- Chen, Yu, Zhenjing Chen, Renyong Guo, Nan Chen, Haifeng Lu, Shuai Huang, Jie Wang, i Lanjuan Li. 2011. „Correlation between Gastrointestinal Fungi and Varying Degrees of Chronic Hepatitis B Virus Infection". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 70 (4): 492–98. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.04.005>.
- Chiaro, Tyson, i June L. Round. 2021. „Fungi prevent intestinal healing". *Science* 371 (6534): 1102–3. <https://doi.org/10.1126/science.abg6017>.
- Chidambaranathan-Reghupaty, Saranya, Paul B. Fisher, i Devanand Sarkar. 2021. „Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification". *Advances in cancer research* 149:1–61. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.10.001>.
- Chu, Huikuan, Yi Duan, Sonja Lang, Lu Jiang, Yanhan Wang, Cristina Llorente, Jinyuan Liu, i in. 2020. „The *Candida Albicans* Exotoxin Candidalysin Promotes Alcohol-Associated Liver Disease". *Journal of Hepatology* 72 (3): 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.09.029>.
- Cui, Lijia, Alison Morris, i Elodie Ghedin. 2013. „The Human Mycobiome in Health and Disease". *Genome Medicine* 5 (7): 63. <https://doi.org/10.1186/gm467>.
- Dalton, H. K., R. G. Board, i R. R. Davenport. 1984. „The Yeasts of British Fresh Sausage and Minced Beef". *Antonie Van Leeuwenhoek* 50 (3): 227–48. <https://doi.org/10.1007/BF02342134>.
- D'Amore, Rosalinda, Umer Zeeshan Ijaz, Melanie Schirmer, John G. Kenny, Richard Gregory, Alistair C. Darby, Migun Shakya, Mircea Podar, Christopher Quince, i Neil Hall. 2016. „A Comprehensive Benchmarking Study of Protocols and Sequencing Platforms for 16S rRNA Community Profiling". *BMC Genomics* 17 (styczeń):55. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2194-9>.
- Das, A., E. O'Herlihy, F. Shanahan, P. W. O'Toole, i I. B. Jeffery. 2021. „The Fecal Mycobiome in Patients with Irritable Bowel Syndrome". *Scientific Reports* 11 (1): 124. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79478-6>.
- Demir, Münevver, Sonja Lang, Phillipp Hartmann, Yi Duan, Anna Martin, Yukiko Miyamoto, Marina Bondareva, i in. 2022. „The Fecal Mycobiome in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease". *Journal of Hepatology* 76 (4): 788–99. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.11.029>.
- Dohlman, Anders B., Jared Klug, Marissa Mesko, Iris H. Gao, Steven M. Lipkin, Xiling Shen, i Iliyan D. Iliev. 2022. „A Pan-Cancer Mycobiome Analysis Reveals Fungal Involvement in Gastrointestinal and Lung Tumors". *Cell* 185 (20): 3807-3822.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.015>.

- Duan, Zhen, Yang Zhang, Caiping Zhu, Yuan Wu, Biqi Du, i Huijie Ji. 2020. „Structural Characterization of Phosphorylated Pleurotus Ostreatus Polysaccharide and Its Hepatoprotective Effect on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice”. *International Journal of Biological Macromolecules* 162 (listopad):533–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.107>.
- Everard, Amandine, Sébastien Matamoros, Lucie Geurts, Nathalie M. Delzenne, i Patrice D. Cani. 2014. „Saccharomyces Boulardii Administration Changes Gut Microbiota and Reduces Hepatic Steatosis, Low-Grade Inflammation, and Fat Mass in Obese and Type 2 Diabetic Db/Db Mice”. *mBio* 5 (3): e01011-01014. <https://doi.org/10.1128/mBio.01011-14>.
- Fleet, G.h. 1990. „Yeasts in Dairy Products”. *Journal of Applied Bacteriology* 68 (3): 199–211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02566.x>.
- Frey-Klett, P., P. Burlinson, A. Deveau, M. Barret, M. Tarkka, i A. Sarniguet. 2011. „Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 75 (4): 583–609. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-11>.
- Fujiwara, Naoto, Hayato Nakagawa, Kenichiro Enooku, Yotaro Kudo, Yuki Hayata, Takuma Nakatsuka, Yasuo Tanaka, i in. 2018. „CPT2 Downregulation Adapts HCC to Lipid-Rich Environment and Promotes Carcinogenesis via Acylcarnitine Accumulation in Obesity”. *Gut* 67 (8): 1493–1504. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315193>.
- Gao, Wenkang, Yixin Zhu, Jin Ye, i Huikuan Chu. 2021. „Gut Non-Bacterial Microbiota Contributing to Alcohol-Associated Liver Disease”. *Gut Microbes* 13 (1): 1984122. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1984122>.
- Guo, Renyong, Zhenjing Chen, Nan Chen, i Yu Chen. 2010. „Quantitative Real-Time PCR Analysis of Intestinal Regular Fungal Species in Fecal Samples From Patients With Chronic Hepatitis B Virus Infection”. *Laboratory Medicine* 41 (10): 591–96. <https://doi.org/10.1309/LMMC0WVZXD13PUJG>.
- Gutierrez, Mackenzie W., Erik van Tilburg Bernardes, Diana Changirwa, Braedon McDonald, i Marie-Claire Arrieta. 2022. „“Molding” Immunity—Modulation of Mucosal and Systemic Immunity by the Intestinal Mycobiome in Health and Disease”. *Mucosal Immunology* 15 (4): 573–83. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00515-w>.
- Hamid, Abdu Selim, Isaias Goitom Tesfamariam, Yucheng Zhang, i Zhen Gui Zhang. 2013. „Aflatoxin B1-Induced Hepatocellular Carcinoma in Developing Countries: Geographical Distribution, Mechanism of Action and Prevention”. *Oncology Letters* 5 (4): 1087–92. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1169>.
- Hartmann, Phillipp, Sonja Lang, Suling Zeng, Yi Duan, Xinlian Zhang, Yanhan Wang, Marina Bondareva, i in. 2021. „Dynamic Changes of the Fungal Microbiome in Alcohol Use Disorder”. *Frontiers in Physiology* 12 (lipiec):699253. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.699253>.
- Hoffmann, Christian, Serena Dollive, Stephanie Grunberg, Jun Chen, Hongzhe Li, Gary D. Wu, James D. Lewis, i Frederic D. Bushman. 2013. „Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: Correlations with Diet and Bacterial Residents”. *PloS One* 8 (6): e66019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066019>.
- Hong, Gaichao, Ying Li, Min Yang, Gangping Li, Wei Qian, Hanhua Xiong, Tao Bai, Jun Song, Lei Zhang, i Xiaohua Hou. 2020. „Gut Fungal Dysbiosis and Altered Bacterial-Fungal Interaction in Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome: An Explorative Study”. *Neurogastroenterology & Motility* 32 (11): e13891. <https://doi.org/10.1111/nmo.13891>.
- Hong, Ki Ho, Jeong Won Kim, Se Jin Jang, Eunsil Yu, i Eui-Chong Kim. 2009. „Liver Cirrhosis Caused by Exophiala Dermatitidis”. *Journal of Medical Microbiology* 58 (Pt 5): 674–77. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.002188-0>.

- Huang, Jiafu, Yixin Ou, Tai Wai David Yew, Jingna Liu, Bo Leng, Zhichao Lin, Yi Su, i in. 2016. „Hepatoprotective Effects of Polysaccharide Isolated from *Agaricus Bisporus* Industrial Wastewater against CCl₄-Induced Hepatic Injury in Mice”. *International Journal of Biological Macromolecules* 82 (styczeń):678–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.014>.
- Hussain, S. P., J. Schwank, F. Staib, X. W. Wang, i C. C. Harris. 2007. „TP53 Mutations and Hepatocellular Carcinoma: Insights into the Etiology and Pathogenesis of Liver Cancer”. *Oncogene* 26 (15): 2166–76. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210279>.
- Ishikawa, Hisashi, Akinobu Takaki, Ryuichiro Tsuzaki, Tetsuya Yasunaka, Kazuko Koike, Yasuyuki Shimomura, Hiroyuki Seki, i in. 2014. „L-Carnitine Prevents Progression of Non-Alcoholic Steatohepatitis in a Mouse Model with Upregulation of Mitochondrial Pathway”. *PloS One* 9 (7): e100627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100627>.
- Jiang, Tony T., Tzu-Yu Shao, W. X. Gladys Ang, Jeremy M. Kinder, Lucien H. Turner, Giang Pham, Jordan Whitt, Theresa Alenghat, i Sing Sing Way. 2017. „Commensal Fungi Recapitulate the Protective Benefits of Intestinal Bacteria”. *Cell Host & Microbe* 22 (6): 809-816.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.013>.
- Kankkunen, Päivi, Laura Teirilä, Johanna Rintahaka, Harri Alenius, Henrik Wolff, i Sampsa Matikainen. 2010. „(1,3)- β -Glucans Activate Both Dectin-1 and NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages”. *The Journal of Immunology* 184 (11): 6335–42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903019>.
- Katt, Janosch, Dorothee Schwinge, Tanja Schoknecht, Alexander Quaas, Ingo Sobottka, Eike Burandt, Christoph Becker, i in. 2013. „Increased T Helper Type 17 Response to Pathogen Stimulation in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis”. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58 (3): 1084–93. <https://doi.org/10.1002/hep.26447>.
- Ketchum, Remi N., Edward G. Smith, Grace O. Vaughan, Britney L. Phippen, Dain McParland, Noura Al-Mansoori, Tyler J. Carrier, John A. Burt, i Adam M. Reitzel. 2018. „DNA Extraction Method Plays a Significant Role When Defining Bacterial Community Composition in the Marine Invertebrate *Echinometra Mathaei*”. *Frontiers in Marine Science* 5 (lipiec). <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00255>.
- Kew, Michael C. 2013. „Aflatoxins as a Cause of Hepatocellular Carcinoma”. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases: JGLD* 22 (3): 305–10.
- Kim, Yong Sung, Tatsuya Unno, Byung-Yong Kim, i Mi-Sung Park. 2020. „Sex Differences in Gut Microbiota”. *The World Journal of Men's Health* 38 (1): 48. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190009>.
- Krause, R., i E. C. Reisinger. 2005. „Candida and Antibiotic-Associated Diarrhoea”. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 11 (1): 1–2. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00978.x>.
- Lang, Sonja, Yi Duan, Jinyuan Liu, Manolito G. Torralba, Claire Kuelbs, Meritxell Ventura-Cots, Juan G. Abraldes, i in. 2020. „Intestinal Fungal Dysbiosis and Systemic Immune Response to Fungi in Patients With Alcoholic Hepatitis”. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 71 (2): 522–38. <https://doi.org/10.1002/hep.30832>.
- Lemoinne, Sara, Astrid Kemgang, Karima Ben Belkacem, Marjolène Straube, Sarah Jegou, Christophe Corpechot, Saint-Antoine IBD Network, Olivier Chazouillères, Chantal Housset, i Harry Sokol. 2020. „Fungi Participate in the Dysbiosis of Gut Microbiota in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis”. *Gut* 69 (1): 92–102. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317791>.
- Levy, Maayan, Christoph A. Thaiss, David Zeevi, Lenka Dohnalová, Gili Zilberman-Schapira, Jemal Ali Mahdi, Eyal David, i in. 2015. „Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling”. *Cell* 163 (6): 1428–43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.048>.

- Li, Heng. 2013. „Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM”. *ArXiv* 1303 (marzec).
- Li, Runzhi, i Shu Zhu. 2020. „NLRP6 Inflammasome”. *Molecular Aspects of Medicine* 76 (grudzień):100859. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100859>.
- Li, Shangshang, Juan Li, Jianjun Zhang, Wenshuai Wang, Xiuxiu Wang, Huijuan Jing, Zhenzhen Ren, i in. 2017. „The Antioxidative, Antiaging, and Hepatoprotective Effects of Alkali-Extractable Polysaccharides by *Agaricus Bisporus*”. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2017:7298683. <https://doi.org/10.1155/2017/7298683>.
- Li, Xin V., Irina Leonardi, i Iliyan D. Iliev. 2019. „Gut mycobiota in immunity and inflammatory disease”. *Immunity* 50 (6): 1365–79. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.023>.
- Li, Xinyang, Jun Shen, i Zhihua Ran. 2017. „Crosstalk between the Gut and the Liver via Susceptibility Loci: Novel Advances in Inflammatory Bowel Disease and Autoimmune Liver Disease”. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 175 (luty):115–23. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.10.006>.
- Liu, Y. T., Y. Q. Li, i Y. Z. Wang. 2016. „[Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against intestinal mucosal barrier injury in rats with nonalcoholic fatty liver disease]”. *Chinese Journal of Hepatology* 24 (12): 921–26. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2016.12.009>.
- Liu, Yang, Dandan Zheng, Ling Su, Qi Wang, i Yu Li. 2018. „Protective Effect of Polysaccharide from *Agaricus Bisporus* in Tibet Area of China against Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice”. *International Journal of Biological Macromolecules* 118 (Pt B): 1488–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.179>.
- Liu, Zherui, Yinyin Li, Chen Li, Guanglin Lei, Lin Zhou, Xiangling Chen, Xiaodong Jia, i Yinying Lu. 2022. „Intestinal *Candida albicans* Promotes Hepatocarcinogenesis by Up-Regulating NLRP6”. *Frontiers in Microbiology* 13.
- Loftus, E. V., G. C. Harewood, C. G. Loftus, W. J. Tremaine, W. S. Harmsen, A. R. Zinsmeister, D. A. Jewell, i W. J. Sandborn. 2005. „PSC-IBD: A Unique Form of Inflammatory Bowel Disease Associated with Primary Sclerosing Cholangitis”. *Gut* 54 (1): 91–96. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.046615>.
- Lu, Jennifer, Florian Breitwieser, Peter Thielen, i Steven Salzberg. 2017. „Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data”. *PeerJ Computer Science* 3 (styczeń):e104. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>.
- Mar Rodríguez, M., Daniel Pérez, Felipe Javier Chaves, Eduardo Esteve, Pablo Marin-Garcia, Gemma Xifra, Joan Vendrell, i in. 2015. „Obesity Changes the Human Gut Mycobiome”. *Scientific Reports* 5 (1): 14600. <https://doi.org/10.1038/srep14600>.
- Markle, Janet G. M., Daniel N. Frank, Steven Mortin-Toth, Charles E. Robertson, Leah M. Feazel, Ulrike Rolle-Kampczyk, Martin von Bergen, Kathy D. McCoy, Andrew J. Macpherson, i Jayne S. Danska. 2013. „Sex Differences in the Gut Microbiome Drive Hormone-Dependent Regulation of Autoimmunity”. *Science (New York, N.Y.)* 339 (6123): 1084–88. <https://doi.org/10.1126/science.1233521>.
- Miao, Yu Rebecca, Kaushik N. Thakkar, Jin Qian, Mihal S. Kariolis, Wei Huang, Saravanan Nandagopal, Teddy Tat Chi Yang, i in. 2021. „Neutralization of PD-L2 is Essential for Overcoming Immune Checkpoint Blockade Resistance in Ovarian Cancer”. *Clinical Cancer Research* 27 (15): 4435–48. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0482>.
- Morales, Pamela, Jerusa Brignardello, i Martín Gotteland. 2010. „[The association of intestinal microbiota with obesity]”. *Revista Medica De Chile* 138 (8): 1020–27. <https://doi.org/S0034-98872010000800013>.

- Mou, Haijuan, Fengying Yang, Jianqin Zhou, i Cuixia Bao. 2018. „Correlation of Liver Function with Intestinal Flora, Vitamin Deficiency and IL-17A in Patients with Liver Cirrhosis”. *Experimental and Therapeutic Medicine* 16 (5): 4082–88. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6663>.
- Multhoff, Gabriele, Michael Molls, i Jürgen Radons. 2012. „Chronic Inflammation in Cancer Development”. *Frontiers in Immunology* 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2011.00098>.
- Muratori, P., L. Muratori, M. Guidi, S. Maccariello, G. Pappas, R. Ferrari, P. Gionchetti, M. Campieri, i F. B. Bianchi. 2003. „Anti-Saccharomyces Cerevisiae Antibodies (ASCA) and Autoimmune Liver Diseases”. *Clinical and Experimental Immunology* 132 (3): 473–76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02166.x>.
- Nakamoto, Nobuhiro, Nobuo Sasaki, Ryo Aoki, Kentaro Miyamoto, Wataru Suda, Toshiaki Teratani, Takahiro Suzuki, i in. 2019. „Gut Pathobionts Underlie Intestinal Barrier Dysfunction and Liver T Helper 17 Cell Immune Response in Primary Sclerosing Cholangitis”. *Nature Microbiology* 4 (3): 492–503. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0333-1>.
- Narunsky-Haziza, Lian, Gregory D. Sepich-Poore, Ilana Livyatan, Omer Asraf, Cameron Martino, Deborah Nejman, Nancy Gavert, i in. 2022. „Pan-Cancer Analyses Reveal Cancer-Type-Specific Fungal Ecologies and Bacteriome Interactions”. *Cell* 185 (20): 3789-3806.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.005>.
- Nash, Andrea K., Thomas A. Auchtung, Matthew C. Wong, Daniel P. Smith, Jonathan R. Gesell, Matthew C. Ross, Christopher J. Stewart, i in. 2017. „The Gut Mycobiome of the Human Microbiome Project Healthy Cohort”. *Microbiome* 5 (1): 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>.
- Neagu, Monica, Carolina Constantin, Constantin Caruntu, Carmen Dumitru, Mihaela Surcel, i Sabina Zurac. 2019. „Inflammation: A Key Process in Skin Tumorigenesis”. *Oncology Letters* 17 (5): 4068–84. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9735>.
- Ou, Tzu-Ming, Hsin-Hung Huang, Tsai-Yuan Hsieh, Wei-Kuo Chang, Heng-Cheng Chu, Chin-Hui Hsu, Yu-Lueng Shih, Tien-Yu Huang, Peng-Jen Chen, i Hsuan-Hwai Lin. 2014. „Liver Cirrhosis as a Predisposing Factor for Esophageal Candidiasis”. *Advances in Digestive Medicine* 1 (3): 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.aidm.2013.09.005>.
- Oztas, Erkin, Bulent Odemis, Murat Kekilli, Mevlut Kurt, Bedia Mert Dinc, Erkan Parlak, Ayse Kalkanci, i Nurgul Sasmaz. 2009. „Systemic Phaeohyphomycosis Resembling Primary Sclerosing Cholangitis Caused by Exophiala Dermatitis”. *Journal of Medical Microbiology* 58 (Pt 9): 1243–46. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.008706-0>.
- Peleg, Anton Y., Deborah A. Hogan, i Eleftherios Mylonakis. 2010. „Medically Important Bacterial–Fungal Interactions”. *Nature Reviews Microbiology* 8 (5): 340–49. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2313>.
- Pérez, J. Christian. 2021. „Fungi of the Human Gut Microbiota: Roles and Significance”. *International Journal of Medical Microbiology* 311 (3): 151490. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151490>.
- Ponziani, Francesca Romana, Sherrie Bhoori, Chiara Castelli, Lorenza Putignani, Licia Rivoltini, Federica Del Chierico, Maurizio Sanguinetti, i in. 2019. „Hepatocellular Carcinoma Is Associated With Gut Microbiota Profile and Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease”. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 69 (1): 107–20. <https://doi.org/10.1002/hep.30036>.
- Qian, G. S., R. K. Ross, M. C. Yu, J. M. Yuan, Y. T. Gao, B. E. Henderson, G. N. Wogan, i J. D. Groopman. 1994. „A Follow-up Study of Urinary Markers of Aflatoxin Exposure and Liver Cancer Risk in Shanghai, People’s Republic of China”. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 3 (1): 3–10.

- Quince, Christopher, Alan W. Walker, Jared T. Simpson, Nicholas J. Loman, i Nicola Segata. 2017. „Shotgun Metagenomics, from Sampling to Analysis”. *Nature Biotechnology* 35 (9): 833–44. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>.
- Ren, Zhigang, Ang Li, Jianwen Jiang, Lin Zhou, Zujiang Yu, Haifeng Lu, Haiyang Xie, i in. 2019. „Gut Microbiome Analysis as a Tool towards Targeted Non-Invasive Biomarkers for Early Hepatocellular Carcinoma”. *Gut* 68 (6): 1014–23. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315084>.
- Richard, Mathias L., i Harry Sokol. 2019. „The Gut Mycobiota: Insights into Analysis, Environmental Interactions and Role in Gastrointestinal Diseases”. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16 (6): 331–45. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0121-2>.
- Richardson, Jonathan P, i David L Moyes. 2015. „Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection”. *Virulence* 6 (4): 327–37. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1004977>.
- Rizzetto, Lisa, Daniela C. Ifrim, Silvia Moretti, Noemi Tocci, Shih-Chin Cheng, Jessica Quintin, Giorgia Renga, i in. 2016. „Fungal Chitin Induces Trained Immunity in Human Monocytes during Cross-Talk of the Host with *Saccharomyces Cerevisiae*”. *The Journal of Biological Chemistry* 291 (15): 7961–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.699645>.
- Rudolph, Gerda, Daniel Gotthardt, Petra Klöters-Plachky, Hasan Kulaksiz, Daniel Rost, i Adolf Stiehl. 2009. „Influence of Dominant Bile Duct Stenoses and Biliary Infections on Outcome in Primary Sclerosing Cholangitis”. *Journal of Hepatology* 51 (1): 149–55. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.023>.
- Samonis, G., A. Gikas, E. J. Anaissie, G. Vrenzos, S. Maraki, Y. Tselentis, i G. P. Bodey. 1993. „Prospective Evaluation of Effects of Broad-Spectrum Antibiotics on Gastrointestinal Yeast Colonization of Humans”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (1): 51–53. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.1.51>.
- Santino, I., A. Alari, S. Bono, E. Teti, M. Marangi, A. Bernardini, L. Magrini, S. Di Somma, i A. Teggi. 2014. „*Saccharomyces Cerevisiae* Fungemia, a Possible Consequence of the Treatment of *Clostridium Difficile* Colitis with a Probioticum”. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 27 (1): 143–46. <https://doi.org/10.1177/039463201402700120>.
- Schloss, Patrick D. 2018. „Identifying and Overcoming Threats to Reproducibility, Replicability, Robustness, and Generalizability in Microbiome Research”. *mBio* 9 (3): e00525-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00525-18>.
- Schneider, Samantha L., Andrew L. Ross, i James M. Grichnik. 2015. „Do Inflammatory Pathways Drive Melanomagenesis?” *Experimental Dermatology* 24 (2): 86–90. <https://doi.org/10.1111/exd.12502>.
- Schneider, Valerie A., Tina Graves-Lindsay, Kerstin Howe, Nathan Bouk, Hsiu-Chuan Chen, Paul A. Kitts, Terence D. Murphy, i in. 2017. „Evaluation of GRCh38 and de Novo Haploid Genome Assemblies Demonstrates the Enduring Quality of the Reference Assembly”. *Genome Research* 27 (5): 849–64. <https://doi.org/10.1101/gr.213611.116>.
- Seelbinder, Bastian, Jiarui Chen, Sascha Brunke, Ruben Vazquez-Urbe, Rakesh Santhaman, Anne-Christin Meyer, Felipe Senne de Oliveira Lino, i in. 2020. „Antibiotics create a shift from mutualism to competition in human gut communities with a longer-lasting impact on fungi than bacteria”. *Microbiome* 8 (1): 133. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00899-6>.
- Shuai, Menglei, Yuanqing Fu, Hai-Li Zhong, Wanglong Gou, Zengliang Jiang, Yuhui Liang, Zelei Miao, i in. 2022. „Mapping the Human Gut Mycobiome in Middle-Aged and Elderly Adults: Multiomics Insights and Implications for Host Metabolic Health”. *Gut*, styczeń, gutjnl-2021-326298. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326298>.
- Sokol, Harry, Valentin Leducq, Hugues Aschard, Hang-Phuong Pham, Sarah Jegou, Cecilia Landman, David Cohen, i in. 2017. „Fungal Microbiota Dysbiosis in IBD”. *Gut* 66 (6): 1039–48. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746>.

- Steinshamn, S., M. H. Bemelmans, L. J. van Tits, K. Bergh, W. A. Buurman, i A. Waage. 1996. „TNF Receptors in Murine Candida Albicans Infection: Evidence for an Important Role of TNF Receptor P55 in Antifungal Defense”. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 157 (5): 2155–59.
- Strati, Francesco, Monica Di Paola, Irene Stefanini, Davide Albanese, Lisa Rizzetto, Paolo Lionetti, Antonio Calabrò, i in. 2016. „Age and Gender Affect the Composition of Fungal Population of the Human Gastrointestinal Tract”. *Frontiers in Microbiology* 7 (sierpień):1227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01227>.
- Sun, Shanshan, Li Sun, Kai Wang, Shanshan Qiao, Xinyue Zhao, Xiaomin Hu, Wei Chen, i in. 2021. „The Gut Commensal Fungus, Candida Parapsilosis, Promotes High Fat-Diet Induced Obesity in Mice”. *Communications Biology* 4 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02753-3>.
- Sun, Shanshan, Kai Wang, Li Sun, Baosong Cheng, Shanshan Qiao, Huanqin Dai, Wenyu Shi, Juncai Ma, i Hongwei Liu. 2020. „Therapeutic Manipulation of Gut Microbiota by Polysaccharides of Wolfiporia Cocos Reveals the Contribution of the Gut Fungi-Induced PGE2 to Alcoholic Hepatic Steatosis”. *Gut Microbes* 12 (1): 1830693. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1830693>.
- Sun, Yang, Tao Zuo, Chun Pan Cheung, Wenxi Gu, Yating Wan, Fen Zhang, Nan Chen, i in. 2021. „Population-Level Configurations of Gut Mycobiome Across 6 Ethnicities in Urban and Rural China”. *Gastroenterology* 160 (1): 272–286.e11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.014>.
- Tortora, Gerard J, i Nicholas P Anagnostakos. 1987. „The Digestive System”. W *Principles of Anatomy and Physiology (5th Edition)*. New York, NY: Harper & Row.
- Truong, Duy Tin, Eric A. Franzosa, Timothy L. Tickle, Matthias Scholz, George Weingart, Edoardo Pasolli, Adrian Tett, Curtis Huttenhower, i Nicola Segata. 2015. „MetaPhlAn2 for Enhanced Metagenomic Taxonomic Profiling”. *Nature Methods* 12 (10): 902–3. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3589>.
- Turnbaugh, Peter J., Fredrik Bäckhed, Lucinda Fulton, i Jeffrey I. Gordon. 2008. „Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome”. *Cell Host & Microbe* 3 (4): 213–23. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>.
- Turnbaugh, Peter J., Ruth E. Ley, Michael A. Mahowald, Vincent Magrini, Elaine R. Mardis, i Jeffrey I. Gordon. 2006. „An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest”. *Nature* 444 (7122): 1027–31. <https://doi.org/10.1038/nature05414>.
- Turner, P. C., M. Mendy, H. Whittle, M. Fortuin, A. J. Hall, i C. P. Wild. 2000. „Hepatitis B Infection and Aflatoxin Biomarker Levels in Gambian Children”. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH* 5 (12): 837–41. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00664.x>.
- Underhill, David M., i Iliyan D. Iliev. 2014. „The Mycobiota: Interactions between Commensal Fungi and the Host Immune System”. *Nature Reviews Immunology* 14 (6): 405–16. <https://doi.org/10.1038/nri3684>.
- Valeri, Francesco, i Kristina Endres. 2021. „How Biological Sex of the Host Shapes Its Gut Microbiota”. *Frontiers in Neuroendocrinology* 61 (kwiecień):100912. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100912>.
- Verma, Nipun, Akash Roy, Shreya Singh, Pranita Pradhan, Pratibha Garg, i Meenu Singh. 2022. „Factors determining the mortality in cirrhosis patients with invasive candidiasis: A systematic review and meta-analysis”. *Medical Mycology* 60 (1): myab069. <https://doi.org/10.1093/mmy/myab069>.
- Wang, Xia, i Yong Lin. 2008. „Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?” *Acta pharmacologica Sinica* 29 (11): 1275–88.
- Wesolowska-Andersen, Agata, Martin Iain Bahl, Vera Carvalho, Karsten Kristiansen, Thomas Sicheritz-Pontén, Ramneek Gupta, i Tine Rask Licht. 2014. „Choice of Bacterial DNA

- Extraction Method from Fecal Material Influences Community Structure as Evaluated by Metagenomic Analysis". *Microbiome* 2 (1): 19. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-19>.
- Wood, Derrick E., Jennifer Lu, i Ben Langmead. 2019. „Improved Metagenomic Analysis with Kraken 2". *Genome Biology* 20 (1): 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>.
- Wu, Xiaoyan, Yaoyao Xia, Fang He, Congrui Zhu, i Wenkai Ren. 2021. „Intestinal mycobiota in health and diseases: from a disrupted equilibrium to clinical opportunities". *Microbiome* 9 (1): 60. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01024-x>.
- Yang, An-Ming, Tatsuo Inamine, Katrin Hochrath, Peng Chen, Lirui Wang, Cristina Llorente, Sena Bluemel, i in. 2017. „Intestinal Fungi Contribute to Development of Alcoholic Liver Disease". *The Journal of Clinical Investigation* 127 (7): 2829–41. <https://doi.org/10.1172/JCI90562>.
- Yang, Yajing, Guoqiang Chen, Xiaoqi Zhao, Xiaohe Cao, Lei Wang, Jingjiu Mu, Fenghui Qi, Lijuan Liu, i Haibo Zhang. 2022. „Structural Characterization, Antioxidant and Antitumor Activities of the Two Novel Exopolysaccharides Produced by *Debaryomyces Hansenii* DH-1". *International Journal of Molecular Sciences* 24 (1): 335. <https://doi.org/10.3390/ijms24010335>.
- Yu, Jiayi, Si Ming Li, Yan Kong, Lu Si, Xinan Sheng, Zhihong Chi, Chuanliang Cui, i Jun Guo. 2016. „Association of immune-inflammation index with outcome of high-risk acral melanoma patients treated with adjuvant high-dose interferon." *Journal of Clinical Oncology* 34 (15_suppl): e21070–e21070. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.e21070.
- Yu, Lei, Xue-ke Zhao, Ming-liang Cheng, Guo-zhen Yang, Bi Wang, Hua-juan Liu, Ya-xin Hu, i in. 2017. „*Saccharomyces boulardii* Administration Changes Gut Microbiota and Attenuates D-Galactosamine-Induced Liver Injury". *Scientific Reports* 7 (maj):1359. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01271-9>.
- Yu, Yao, Rong-Rong Wang, Nai-Jun Miao, Jia-Jie Tang, Yun-Wei Zhang, Xiang-Ran Lu, Pei-Yi Yan, Jing Wang, i Xin-Ming Jia. 2022. „PD-L1 Negatively Regulates Antifungal Immunity by Inhibiting Neutrophil Release from Bone Marrow". *Nature Communications* 13 (1): 6857. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34722-7>.
- Zeng, Suling, i Bernd Schnabl. 2022. „Roles for the Mycobiome in Liver Disease". *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 42 (4): 729–41. <https://doi.org/10.1111/liv.15160>.
- Zhai, Bing, Mihaela Ola, Thierry Rolling, Nicholas L. Tosini, Sari Joshowitz, Eric R. Littmann, Luigi A. Amoretti, i in. 2020. „High-Resolution Mycobiota Analysis Reveals Dynamic Intestinal Translocation Preceding Invasive Candidiasis". *Nature Medicine* 26 (1): 59–64. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0709-7>.
- Zhang, Lin, Hui Zhan, Wenye Xu, Shuai Yan, i Siew C. Ng. 2021. „The role of gut mycobiome in health and diseases". *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 14 (wrzesień):17562848211047130. <https://doi.org/10.1177/17562848211047130>.
- Zhao, Bin, Hong Zhao, i Jiabin Zhao. 2020. „Efficacy of PD-1/PD-L1 blockade monotherapy in clinical trials". *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 12 (lipiec):1758835920937612. <https://doi.org/10.1177/1758835920937612>.
- Zhou, Lina, Lili Ding, Peiyuan Yin, Xin Lu, Xiaomei Wang, Junqi Niu, Pujun Gao, i Guowang Xu. 2012. „Serum Metabolic Profiling Study of Hepatocellular Carcinoma Infected with Hepatitis B or Hepatitis C Virus by Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry". *Journal of Proteome Research* 11 (11): 5433–42. <https://doi.org/10.1021/pr300683a>.
- Zhou, Xingyu, Xiang Zhang, i Jun Yu. 2024. „Gut mycobiome in metabolic diseases: Mechanisms and clinical implication". *Biomedical Journal* 47 (3): 100625. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2023.100625>.
- Zullo, Angelo, Cesare Hassan, Lorenzo Ridola, Roberto Lorenzetti, Salvatore Ma Campo, i Oliviero Riggio. 2012. „Rifaximin Therapy and Hepatic Encephalopathy: Pros and Cons". *World*

Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics 3 (4): 62–67.
<https://doi.org/10.4292/wjgpt.v3.i4.62>.



PODPIS ZAUFANY

NATALIA MARIA
SZÓSTAK

05.06.2025 10:29:43 [GMT+2]

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

.....

(podpis wnioskodawcy)