

## Recenzja rozprawy doktorskiej

Autor: Mgr Julia Grajek

Tytuł: Mathematical modelling of the tumor microenvironment with the aim of studying its heterogeneity as a driver of treatment resistance and a potential therapy target

Promotor: Prof. dr hab. Jan Poleszczuk

### Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest napisana w języku angielskim. Liczy 127 stron tekstu, składa się ze streszczenia, wstępu, rozdziału formułującego cele rozprawy i hipotezy, trzech rozdziałów opisujących rozwinięte modele matematyczne mikrośrodowiska guza i wpływu jego heterogeniczności na oporność na leczenie i ostatniego rozdziału, którym jest dyskusja. Szeroka bibliografia do pracy liczy 104 pozycje. Zagadnienia badane w rozprawie z jednej strony są bardzo ważne dla stale rozwijanych strategii diagnostyki i terapii chorób nowotworowych, a z drugiej strony bazują na oryginalnych, interesujących i zaawansowanych metodach modelowania matematycznego. Dlatego wybór tematyki rozprawy należy uznać za bardzo trafny i ciekawy.

Rozdział drugi pracy ma charakter wstępny. Składa się z dwóch podrozdziałów. Pierwszy z nich jest streszczeniem podstawowej wiedzy biologicznej i fizjologicznej dotyczącej rozwoju guza, a w szczególności czynników wpływających na prognozowanie / oporność na terapie antynowotworowe. Opis koncentruje się na immunoterapii nowotworów oraz na czynnikach generujących oporność na immunoterapię. Charakteryzuje się schemat działania układu immunologicznego organizmu w reakcji na zagrożenie nowotworzeniem. Opiswane są punkty kontrolne immunoodporności (np. CTLA-4, PD-1), które pozwalają na ograniczenie / zatrzymanie działania komórek T układu odpornościowego. Jednym z mechanizmów „ucieczki” komórek nowotworowych przed działaniem układu immunologicznego jest wytworzenie przez na ich powierzchni ligandów

(np. PDL-1). Immunoterapie mogą mieć na celu przerwanie aktywności ścieżek punktów kontrolnych immunoodporności (blokowanie działania ligandów lub receptorów i aktywację komórek odpornościowych T). Projektowanie leków dla immunoterapii nowotworów, monitorowanie ich funkcjonowania, ocena skuteczności i prognozowanie wyników terapii to złożone zagadnienia, które wymagają wiele uwagi i badań. Opisuje się podstawowe problemy w tym obszarze. Jako jeden z czynników, któremu w ostatnich latach poświęca się coraz więcej uwagi w badaniach wymienia heterogeniczność guza oraz wpływ mikrośrodowiska guza. Wpływ tych dwóch czynników jest głównym polem badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej. W szczególności przedmiotem zainteresowania Doktorantki jest opis poziomu (niskich wartości) pH oraz populacji macierzystych komórek nowotworowych na oporność na leczenie. Celowość takiej orientacji badań zilustrowana jest na rysunku 2.2 przedstawiającym mechanizm kształtowania się wartości pH w mikrośrodowisku guza oraz w podpunkcie 2.1.2 oraz na rysunku 2.3 charakteryzującym odporność na radioterapię macierzystych komórek nowotworowych.

Druga część rozdziału wstępnego (podrozdział 2.2) poświęcona jest ogólnemu omówieniu technik modelowania matematycznego (in silico) w onkologii. Podrozdział 2.2 rozpoczyna się od wymienienia najstarszych, jednak bardzo interesujących modeli, w których liczebności komórek nowotworowych oraz oddziaływania pomiędzy komórkami układu immunologicznego oraz komórkami nowotworowymi były opisywane układami równań różniczkowych typu wzrostu wykładniczego, gompertzowskiego, Bertalanffiego, w których (po prawej stronie) dodawano składnik odpowiedzialny za oddziaływania oraz dodawano równanie opisujące populację komórek układu odpornościowego. W takim ujęciu w naturalny sposób dostaje się nawiązanie do modeli typu drapieżca – ofiara (prey – predator). Przedstawia się kompetentny i wyczerpujący przegląd odpowiednich pozycji literatury. Omawia się także własności tych modeli matematycznych. W dalszej części podrozdziału 2.2 Doktorantka dokonuje opisu bardziej zaawansowanych, współczesnych prac poświęconych modelowaniu oddziaływań układu odpornościowego z populacją komórek nowotworowych. Złożoność modeli wzrasta z powodu uwzględniania różnych typów komórek, poziomów koncentracji białek, w niektórych z cytowanych publikacji dodaje się także aspekt przestrzenny w ewolucji populacji komórek nowotworowych, co często prowadzi do cząstkowych równań różniczkowych. Istotnym wątkiem w rozwijanych metodach jest także modelowanie dyskretne wiążące z takimi modelami jak systemy agentowe czy automaty komórkowe. Doktorantka podkreśla także znaczenie wiązania modeli rozwoju guza z modelowaniem przebiegu terapii (radioterapii) i omawia podstawowe prace w literaturze (często cytowane) między innymi poświęcone modelowi LQ (liniowo – kwadratowemu) wpływu dawki promieniowania na przeżywalność komórek nowotworowych. W opisy metodologii modelowania matematycznego ewolucji populacji komórek nowotworowych oraz terapii wpisuje (wplata) wzmianki o publikacjach, których jest współautorką. Jest to bardzo celowa kompozycja, pozwala umieścić wyniki pracy na tle przeglądu literatury.

Rozdział trzeci jest bardzo krótki. Wymienia się w nim (trzy) cele badawcze i (cztery) tezy (hipotezy) pracy. Cele badawcze pracy są bardzo mocno związane z celami badawczymi trzech publikacji naukowych, których współautorką jest Doktorantka. Z kolei uzasadnienie słuszności tez bazuje na wnioskach z wspomnianych publikacji.

Rozdział czwarty pracy bazuje na publikacji, której pierwszą autorką jest Doktorantka:

[1] Grajek, J., Kather, J. N., & Poleszczuk, J. (2023). An in silico model to study the impact of carbonic anhydrase IX expression on tumour growth and anti-PD-1 therapy. *Journal of the Royal Society Interface*, 20(198), 20220654.

Przedstawia się model hybrydowy, składający się z dwóch elementów. Pierwszym jest model agentowy (logika konstrukcji tego modelu jest wyjaśniona w pracy na rysunku 2.4). Opisuje on oddziaływanie pomiędzy układem odpornościowym a komórkami nowotworowymi. Drugim elementem jest układ równań różniczkowych cząstkowych modelujących rozkład przestrzenny stężeń substancji istotnych dla rozwoju guza. Hipotezy badane na bazie rozwiniętych modeli matematycznych są związane z potencjalnym połączeniem dwóch oddziaływań w terapii przeciwnowotworowej. Pierwszym oddziaływaniem jest wspomniane już blokowanie ścieżki PDL-1 jako elementu immunoterapii. Drugim natomiast jest potencjalna inhibicja enzymu CAIX (carbonic anhydrase IX, anhidraza węglanowa IX), który reguluje poziom pH w mikrośrodowisku guza. Wysoka ekspresja enzymu CAIX powoduje zakwaszenie mikrośrodowiska guza i ogranicza oddziaływanie immunoterapii. Dlatego łączenie immunoterapii przez blokowanie PDL-1 z inhibicją CAIX jest potencjalnie drogą do poprawy skuteczności leczenia nowotworu. W pracy uzyskuje się wyniki typu symulacyjnego, pochodzące z numerycznej analizy systemu agentowego przedstawionego na rysunku 1 pracy [1] oraz rozwiązania układu równań cząstkowych przedstawionych w suplemencie do [1]. Uzyskuje się bardzo wyraźne, znamienne statystyczne wnioski. Są one przedstawione na rysunkach 2, 3, 4 pracy [1]. Przedstawiają ogólnie porównanie ewolucji populacji nowotworowej CAIX oraz CAIX-KO. Pierwsza wykazuje ekspresję CAIX, w drugiej dokonuje się knock – outu (inhibicji) CAIX. Prowadzi to do dwóch bardzo interesujących wniosków – o skuteczności terapii kombinowanej CAIX, PDL-1 oraz o potencjalnej roli poziomu ekspresji CAIX jako biomarkera rokowania immunoterapii.

Rozdział piąty pracy bazuje na wspólnej publikacji Doktorantki oraz jej Promotora:

[2] Grajek, J., & Poleszczuk, J. (2023). Carbonic anhydrase IX suppression shifts partial response to checkpoint inhibitors into complete tumor eradication: model-based investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10068.,

w której wyniki pracy [1] są zmodyfikowane i dalej rozwinięte. W pracy [2] buduje się dwa modele matematyczne terapii kombinowanej CAIX, PDL-1 o niższej złożoności niż ten badany w pracy [1]. Są to modele opisane układami równań różniczkowych (14) oraz (16) pracy [2]. System (14) w pracy [2] jest tworzony przez układ pięciu równań różniczkowych. Zmiennymi

stanu są objętość populacji komórek nowotworowych, objętość populacji macierzystych komórek nowotworowych, liczba aktywnych przeciwciał T układu odpowrościowego (w mikrośrodku), liczba molekuł interferonu gamma (IFN-gamma), wreszcie liczba protonów w mikrośrodku. Układ pięciu równań różniczkowych jest następnie dalej upraszczany do postaci (16), w której występują już tylko dwa równania różniczkowe. Dzięki temu autorzy publikacji [2] mogą przedstawić interesującą analizę analityczną rozwiązań tego równania, na płaszczyźnie stanu (ES, S) obrazującą zależności pomiędzy liczbą macierzystych komórek nowotworowych (S) oraz liczbą aktywnych komórek T układu odpornościowego (T). Przeprowadzone obliczenia prowadzą do bardzo interesujących wniosków, między innymi, że kombinowana terapia CAIX, PDL-1 może prowadzić do całkowitej eliminacji guza. Z wykorzystaniem opracowane metodologii badano także już analizowane terapie z inną opcją związaną z blokowaniem ścieżki CTLA-4. Przeprowadzone obliczenia prowadziły do wniosku, że terapie pojedyncze (monoterapie) nie zapobiegały wznowom guza, natomiast terapie kombinowane zapewniały (mogły zapewniać przy odpowiednich wartościach parametrów terapii) stabilizację lub eliminację guza.

Rozdział szósty związany jest z publikacją, której współautorką jest Doktorantka:

[3] Schniewind, I., Hadiwikarta, W. W., Grajek, J., Poleszczuk, J., Richter, S., Peitzsch, M., ... & Peitzsch, C. (2022). Cellular plasticity upon proton irradiation determines tumor cell radiosensitivity. *Cell Reports*, 38(8).

Publikacja ta przedstawia wyniki bardzo szerokich badań naukowych, uzyskanych w dużym, interdyscyplinarnym zespole. Podstawowym celem badań w pracy [3] było porównanie efektów radioterapii protonowej oraz fotonowej w aspektach ich zastosowania w onkologii. Doktorantka, w dla potrzeb badań w pracy [3] opracowała model matematyczny plastyczności oraz odwrotnej plastyczności komórek nowotworowych. Model miał postać układu zwyczajnych równań różniczkowych. Inspiracją dla jego opracowania były wcześniejsze prace Promotora. Zgodnie z hipotezą o roli macierzystych komórek nowotworowych w odporności na radioterapię procesy plastyczności (nabycie cech komórek macierzystych przez komórki nowotworowe) oraz odwrotnej plastyczności (utrata cech komórek macierzystych przez nie) grają dużą rolę dynamice i rokowaniach radioterapii. W pracy [3] przedstawiono wyniki eksperymentalne dla trzech nowotworów, prostaty, głowy i szyi oraz glejaka wielopostaciowego. Wnioskami pochodzącymi z pracy [3] są między innymi, że terapia protonowa wydaje się być potencjalnie bardziej skuteczna od terapii fotonowej oraz, że dwukierunkowa plastyczność komórek guza ma istotne znaczenie dla dynamiki zmian liczby komórek nowotworowych oraz macierzystych komórek nowotworowych w odpowiedzi na radioterapię.

### **Ocena rozprawy**

Najważniejszym aspektem w ocenie recenzowanej rozprawy jest oryginalność i nowatorstwo opracowanych modeli matematycznych. Doktorantka wykazuje się bardzo

dobrymi kompetencjami w budowaniu modeli w postaci układów równań różniczkowych, cząstkowych równań różniczkowych oraz modeli w postaci dyskretnych przeskoków stanów. Wykazuje się dojrzałym warsztatem modelowania matematycznego oraz modelowania cyfrowego. W przedstawionych analizach zarówno przedstawia wyniki obliczeniowe – symulacyjne jak też wprowadza logiczne i celowe uproszczenia dla celu uzyskania wyników modelowania w postaci analitycznych relacji. Potrafi analizować wyniki obliczeń i interpretować je w kategoriach biologicznych. Bardzo godny podkreślenia jest fakt dużej dbałości o przedstawienie wniosków z przeprowadzonych obliczeń i symulacji oraz ich potencjalnego znaczenia dla diagnostyki i planowania terapii w onkologii.

Praca ma bezpośrednie odniesienie do trzech oryginalnych publikacji naukowych. W dwóch z trzech wymienionych powyżej publikacjach Doktorantka jest pierwszą autorką. W treści pracy oraz w tekstach publikacji jest udokumentowany istotny udział Doktorantki w opracowaniu publikacji i jej główna rola w modelowaniu matematycznym. Oprócz trzech wymienionych powyżej prac Doktorantka jest współautorką innych wysoko notowanych publikacji o tematyce zbieżnej z jej pracą doktorską.

Praca jest starannie zredagowana. Niewielkie usterki edycyjne (np. numeracja w rozdziale „summary”) nie utrudniają zrozumienia wyników.

#### **Pytania do doktoratu**

Interesującą kwestią, w mojej opinii wartą bliższego scharakteryzowania w trakcie obrony doktoratu byłyby jakieś bliższe szczegóły implementacyjne dotyczące opracowanego dla potrzeb modelowania matematycznego oprogramowania. Jakie narzędzia stosowano oraz czy opracowywano własne procedury obliczeniowe?

Drugą kwestią w mojej opinii wartą bliższego przedstawienia jest dopasowanie modeli do danych. Doktorantka nazywa też to zagadnienie kalibracją modelu. Jakie metody optymalizacji stosowano? Czy korzystano z gotowych narzędzi?

#### **Konkluzja**

Praca stanowi podsumowanie oryginalnych, interdyscyplinarnych badań naukowych, w których sformułowano i weryfikowano oryginalne hipotezy badawcze. Osiągnięcia i oryginalne elementy rozprawy są na pewno wystarczające do jej ogólnej pozytywnej oceny. Stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki stawiane pracom doktorskim i wnioskuję o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę wniesienie oryginalnego i istotnego wkładu w metodologię i techniki modelowania ewolucji i terapii nowotworów, opublikowanie uzyskanych wyników w renomowanych czasopismach naukowych o wysokiej punktacji, bardzo jasny i logiczny wywód wyników zaprezentowanych w doktoracie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

