

Warszawa, dn. 07.01.2024

Prof. dr hab. Bogdan Kaźmierczak
Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Julii Grajek

”Mathematical modeling of the tumour microenvironment with the aim of studying its heterogeneity as a driver of treatment resistance and a potential therapy target”

Praca została napisana pod kierunkiem dra habilitowanego Jana Poleszczuka, profesora Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN.

Praca dotyczy zastosowania modeli matematycznych do opisu heterogenności mikrośrodowiska otoczenia guza nowotworowego i jego wpływu na jego ewolucję czasoprzestrzenną. Na mikrośrodowisko to składają się w szczególności zwyczajne komórki nowotworowe, nowotworowe komórki macierzyste, naczynia krwionośne, komórki tkanki łącznej oraz macierz pozakomórkowa. Powyższe elementy oddziałują na siebie w różnoraki sposób a oddziaływania te mogą wpływać istotnie na efekty terapii antynowotworowych, w szczególności terapii za pomocą inhibitorów punktów kontrolnych odporności oraz naświetlania promieniowaniem gamma, czy też promieniowaniem protonowym. Jak wiadomo, w przypadku złośliwych guzów nowotworowych, niewłaściwie zaplanowana terapia nie tylko może być nieskuteczna, ale wręcz szkodliwa mogąc w konsekwencji doprowadzić do pogorszenia stanu zdrowia pacjenta poprzez wywołanie reakcji metastatycznej. Analiza wzajemnych oddziaływań pomiędzy komórkami nowotworowymi (zwykłymi lub macierzystymi) a innymi elementami mikrośrodowiska lub też między tymi elementami jest niezwykle istotna. Oprócz wartości poznawczych może ona być podstawą do opracowania nowych protokołów terapeutycznych. Mimo, że przeprowadzona w pracy analiza ma charakter czysto matematyczny, to jednak do określenia większości parametrów zaproponowanych modeli korzysta się w niej z dostępnych danych eksperymentalnych 'in vitro'. Modelowanie przedstawione w pracy ma zatem głębokie podstawy empiryczne. Co więcej, z uwagi na niezwykle restrykcyjne przepisy etyczne dotyczące badań na zwierzętach i niewielką ilość danych klinicznych, modelowanie takie ma charakter awangardowy, porządkujący i może być wstępem do opracowania nowych protokołów terapeutycznych.

Rozprawa doktorska oparta jest na trzech pracach współautorstwa mgr Julii Grajek opublikowanych w latach 2022-2023. Tekst każdej z powyższych prac poprzedzony jest rozdziałem wstępnym. Oprócz tego całość pracy poprzedzona jest wstępem ogólnym stanowiącym wprowadzenie do problematyki poruszanej w rozprawie.

Cele pracy

Tytuł dobrze odzwierciedla zagadnienia podjęte w rozprawie. Zadania, jakie Autorka postawiła przed sobą w badaniach będących podstawą jej rozprawy doktorskiej były następujące:

1. Wyjasnienie zjawiska niskiej wydajności terapii guzów nowotworowych inhibitorami punktów kontrolnych (immune checkpoint inhibitors - ICI) w przypadku wysokiego poziomu ekspresji enzymu CAIX (anhydrazy węglanowej). Terapia inhibitorami punktów kontrolnych reprezentowana jest tutaj przez obniżenie poziomu ekspresji PDL-1, która blokuje aktywację komórek immunologicznych typu T (terapię anti-PD-1). Autorka nie rozpatruje w swoim modelu terapii anti-CTLA-4, gdyż znaczenie tego punktu kontrolnego związane jest z procesami odbywającymi się w węzłach limfatycznych we wstępnej fazie rozwoju nowotworu, w której specyficzne mikrootoczenie nowotworu nie jest jeszcze ukształtowane. Ekspresja anhydrazy węglanowej CAIX ma podwyższoną wartość w przypadku szeregu rodzajów nowotworów. Enzym ten pojawia się na membranie komórek nowotworowych jako efekt niedotlenienia mikrośrodowiska guza nowotworowego wskutek działania czynnika transkrypcyjnego HIF-1 (hypoxia inducible factor). Negatywny wpływ CAIX na mikrośrodowisko guza polega głównie na podwyższeniu jego kwasowości (do około 6.5 pH) poprzez katalizowanie konwersji dwutlenku węgla na wodorowęglan (H_2CO_3^-) oraz proton (H^+). Wzrost kwasowości macierzy pozakomórkowej skutkuje osłabieniem zdolności cytotoksycznych komórek immunologicznej typu T, lub też do ich śmierci. Z drugiej strony, komórki nowotworowe wykształciły swosite mechanizmy obronne przed niedotlenieniem (przejście na oddychanie beztlenowe), są też o wiele bardziej odporne na podwyższoną zawartość jonów wodorowych niż komórki immunologiczne. W rezultacie, terapia inhibitorami punktów kontrolnych przynosi statystycznie bardzo słabe efekty. Z drugiej strony, terapia taka zastosowana do guzów nowotworowych z usuniętą ekspresją anhydrazy węglanowej CAIX (np. za pomocą inhibitora SLC-0111), jest o wiele bardziej wydajna i często doprowadza do pełnej eradykacji. Niska ekspresja CAIX może być zatem sensownym bio-wskaźnikiem powodzenia terapii anti-PD-1.
2. Opracowanie prostego modelu matematycznego opisującego oddziaływanie guza nowotworowego z jego mikrootoczeniem, w szczególności z komórkami immunologicznymi typu T, w procesie terapii polegającej na inhibicji punktu kontrolnego PD-1 i jednoczesnym obniżeniu ekspresji genu anhydrazy węglanowej CAIX, sformułowanego w języku równań różniczkowych zwyczajnych, którego analiza pozwoliłaby na znalezienie obszarów w przestrzeni parametrów zapewniających pozytywny przebieg leczenia.

3. Konstrukcja i analiza modelu matematycznego opisującego zjawiska zachodzące w radioterapii guza, w szczególności na uchwyceniu różnic w procesach plastyczności komórek nowotworowych pomiędzy radioterapią fotonową a protonową. Plastyczność komórek nowotworowych stanowi kluczową charakterystykę efektywności zastosowanej metody radioterapeutycznej.

Realizacja celów rozprawy

Realizacja pierwszego z postawionych zadań (1.) została przedstawiona w pracy

P1 *Grajek J, Kather JN, Poleszczuk J. 2023 An in silico model to study the impact of carbonic anhydrase IX expression on tumour growth and anti-PD-1 therapy. J. R. Soc. Interface 20.*

W pracy tej rozważony jest hybrydowy agentowo-różniczkowy układ opisujący ewolucję czasowo-przestrzenną komórek nowotworowych, limfocytów T i innych komórek otoczenia guza. Komórki te umieszczone są się na periodycznej sieci trójwymiarowej. Z prawdopodobieństwem zależnym od lokalnych czynników zewnętrznych, takich jak zawartość tlenu, glukozy, ilości komórek limfatycznych, czy też stopień zakwaszenia mikrootoczenia, komórka nowotworowa może w kolejnym kroku czasowym zainicjować swój podział, umrzeć, przesunąć się na wolną sąsiednią pozycję w sieci, przejść w stan uśpienia, zwiększyć ekspresję PDL-1 lub CAIX, przejść w stan beztlenowej produkcji energii. Ekspresja PDL-1 oraz ekspresja CAIX może z kolei doprowadzić do obniżenia aktywności lub śmierci limfocytów T, chyba że stosujemy terapię anti-PD-1 oraz wyłączymy ekspresję CAIX np. poprzez inhibitor SLC-0111. W swojej części różniczkowej model zawiera układ równań typu reakcji-dyfuzji opisujących przestrzenny rozkład stężeń tlenu, glukozy oraz jonów H^+ wewnątrz guza nowotworowego. Równania te rozwiązuje się w każdym kroku czasowym w zmiennym obszarze wyznaczonym przez granice objętości guza. Część agentowa schematu numerycznego oparta została w zasadniczej części na schemacie z prac [83],[84] Promotora rozprawy. Jak pokreśla Autorka, schemat ten został jednak istotnie zmodyfikowany na potrzeby rozpatrywanego problemu. Został też dodany do niego wspomniany komponent różniczkowy opisujący fizjologię wewnątrzkomórkową. W oparciu o zaproponowany schemat komputerowy, Autorka uzyskała szereg interesujących rezultatów dotyczących terapii anti-PD-1 w układach z naturalnym i obniżonym poziomem ekspresji CAIX. Rezultaty te potwierdzają, że ko-terapia anti-CAIX zwiększa istotnie efektywność inhibitorami punktu kontrolnego PD-1, jeśli chodzi o liczbę przeżywających komórek nowotworowych.

Realizacja drugiego z postawionych zadań (2.) została przedstawiona w pracy

P3 *Grajek, J.; Poleszczuk, J. Carbonic Anhydrase IX Suppression Shifts Partial Response to Checkpoint Inhibitors into Complete Tumor Eradication: Model-Based Investigation. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24. MDPI*

Uproszczony model opisujący zjawiska zachodzące podczas terapii anty-PD-1 oraz anty-CAIX dany jest przez układ zwyczajnych równań różniczkowych (14)-(15). Zmierzonymi w tym układzie są stężenia komórek nowotworowych (C), macierzystych komórek nowotworowych (S), limfocytów T (E), interferonu γ (I) oraz jonów wodorowych (H). Terapie inhibitorami punktów kontrolnych PD-1 i CTLA-4 skalowane są tutaj odpowiednio poprzez stałe d_1 i d_3 a redukcja ekspresji CAIX skalowana jest poprzez stałą d_2 . Model (14)-(15) jest zatem, w pewnym sensie, rozszerzeniem modelu agentowego rozpatrywanego w punkcie 1., w którym ze względów technicznych nie rozpatrywano terapii anty-CTLA-4. W oparciu o zaproponowany model, Autorzy pracy dokonali symulacji numerycznych przebiegu możliwych kombinacji terapeutycznych. Symulacje te potwierdzają istotną rolę redukcji kwasowości mikrootoczenia guza nowotworowego. Praca zawiera również uproszczenie modelu (14)-(15) do postaci (16). Oparte jest ono na fakcie, iż zwykle komórki nowotworowe, w przeciwieństwie do komórek macierzystych umierają z niezamierzonym prawdopodobieństwem.

Realizacja trzeciego z postawionych zadań (3.) została przedstawiona w pracy

P3 *Cellular plasticity upon proton irradiation determines tumor cell radiosensitivity I. Schniewind, W. W. Hadiwikarta, J. Grajek, J. Poleszczuk et al., 2022, Cell Reports 38.*

W powyższej pracy, porównywano m.in. efekty napromieniowania kilku nowotworowych linii komórkowych wiązkami fotonowymi i protonowymi o ustalonej dawce (rzędu 6 Gy). Efekty te były monitorowane przez okres 14 dni. W szczególności w określonych punktach czasowych rejestrowane było stężenie enzymów ALDH⁺ oraz ALDH⁻. Przyjmuje się enzymy te są bardzo dobrymi markerami odpowiednio macierzystych komórek nowotworowych (CSCs) oraz zwykłych komórek nowotworowych (CCs), można zatem na ich podstawie wnioskować o lokalnym w czasie stężeniu frakcji SCCs i CCs. Do matematycznej analizy uzyskanych w eksperymencie wyników Doktorantka zastosowała model opisywany skończoną liczbą równań różniczkowych zwyczajnych, w którym zmiennymi są stężenia odpowiednio zdefiniowanych rodzin zwykłych i macierzystych komórek nowotworowych. Obie grupy komórek dzieli się na podgrupy komórek napromieniowanych (z uszkodzonym DNA) oraz komórek nienapromieniowanych. Dodatkowo, w grupie komórek niemacierzystych (CCs) wyróżnia się podgrupy komórek znajdujących się w i-tym cyklu namnażania. Zaproponowany model jest dostosowaną do warunków eksperymentu wersją agentowych modeli Promotora rozprawy z prac [98], [99]. Kalibracja użytego modelu do otrzymanych danych doświadczalnych pokazała, że w wyniku napromieniowania następują zarówno procesy plastyczności, tj. przechodzenia komórek nowotworowych CCs z uszkodzonym DNA w komórki macierzyste (SCCs), jak i procesy plastyczności odwrotnej, tzn. przechodzenia komórek macierzystych w nieuszkodzone zwykłe komórki nowotworowe (CCs). Co więcej, symulacje numeryczne w ramach zaproponowanego modelu, potwierdziły fakt, że procesy plastyczności zachodzą ze znacznie mniejszą intensywnością w przypadku radiacji protonowej niż w przypadku radiacji fotonowej. Uzyskane na pod-

stawie modelu przebiegi czasowe stężeń komórek nowotworowych (w okresie 14 dni) były również jakościowo zgodne z wynikami eksperymentalnymi. Moim zdaniem, oprócz wartości czysto poznawczych, powyższe rezultaty stanowią istotne osiągnięcia w kontekście opracowywania optymalnych radiacyjnych protokołów terapeutycznych.

Uwagi krytyczne

Na Rys. 2.1 rozprawy, Autorka lokalizuje białka CTLA-4 oraz molekuly CD28 na powierzchni komórek APCs (antigen presenting cells) a ich korespondujące ligandy (B7-1 i B7-2) na membranie limfocytów T, podczas gdy większość najpopularniejszych referencji (np. Sharpe, A., Freeman, G. *The B7-CD28 superfamily*. *Nat Rev Immunol* 2, 116-126 (2002). <https://doi.org/10.1038/nri727>) sugeruje, że jest akurat odwrotnie. Jeśli nie jest to zwykle niedopatrzenie, szkoda, że Autorka nie skomentowała powyższej rozbieżności.

Wprowadzony w pracy P2 układ równań różniczkowych zwyczajnych (16) ma, zgodnie z zamierzeniami Autorki, pozwalać na teoretyczną analizę przebiegu terapii anty-PD-1, anty-CAIX, anty-CTLA-4 w zależności od zastosowanych parametrów terapeutycznych. Wydaje się, że taka teoretyczna analiza została jedynie zainicjowana i nie do końca przeprowadzona. Warunek na nieistnienie niezerowego stanu stacjonarnego (S, ES, I, H) układu (16), takiego, że $S \neq 0$, został sprowadzony do nierówności $c_1 < c_2$, gdzie stałe c_1 i c_2 określone są w równościach (7) i (10), przy czym stała c_1 ma bardzo skomplikowaną postać. Moim zdaniem, warunek ten daje się jednak zapisać w alternatywnej formie, która pozwala na jego (lepiej) zrozumienie. Tak więc, z czwartego równania układu (16) otrzymujemy $H = H_0 + v^{-1}(\delta + q)$. Z trzeciego równania otrzymujemy $I = Erw^{-1}$. Oznaczmy $N = \eta \max(1 - H_{thresh}H^{-1}, 0)$ oraz $R = ES$. Przyrównując prawą stronę drugiego równania do 0, otrzymujemy

$$R = Sb\mu(d + am\mu pL + N)^{-1}. \quad (1)$$

Z pierwszego równania układu (16) otrzymujemy natomiast

$$R = \phi S(1 - SK^{-1})(av_c m\mu(1 - pL))^{-1} \quad (2)$$

Krzywa (2) parabolą a krzywa (1) prostą. Obie krzywe przechodzą przez punkt $(0, 0)$. Aby krzywe nie przecinały się poza tym punktem, pochodna parabol w punkcie $(0, 0)$ musi być mniejsza niż pochodna do krzywej (1). Jeśli zatem

$$\phi(d + am\mu pL + N) < av_c m\mu(1 - pL)b\mu,$$

stan stacjonarny z $S \neq 0$ nie istnieje. Ponieważ, zgodnie z definicją (15), $L \leq 1$, więc warunek ten implikowany jest przez nierówność $\phi(d + am\mu p + N) < av_c m\mu(1 - p)b\mu$.

Co więcej, podobną analizę można przeprowadzić także dla układu wyjściowego (14). L ma w tym przypadku taką samą postać, jak w przypadku uproszczonym. Podobnie, jeśli

$S \neq 0$, to $H = H_0 + v^{-1}(\delta + q(1 - d_3))$ a $N = \eta \max(1 - H_{thresh}H^{-1}, 0)$. Przyrównując prawą stronę trzeciego równania podzielonego przez S do 0, otrzymujemy dla $R := EV$

$$R = Vb\mu(1 + d_2) \left(d + am\mu p(1 - d_1)L + N \right)^{-1}. \quad (3)$$

Dodając dwa pierwsze równania układu (14) otrzymujemy

$$0 = \phi V \left(1 - \frac{V}{K} \right) - 2av_c m\mu(1 - p(1 - d_1)L)R - nV \frac{C}{V}. \quad (4)$$

Tak więc, $0 = V\phi \left(1 - \frac{V}{K} \right) - 2av_c m\mu(1 - p(1 - d_1)L)R - \hat{n}V$, gdzie $\hat{n} \in [0, n)$. Podstawiając za R prawą stronę (3), wnioskujemy, jak w przypadku układu (16), że jeśli

$$\phi(1 - \hat{n}) \left(d + am\mu p(1 - d_1) + N \right) < 2av_c m\mu \left(1 - p(1 - d_1) \right) b\mu(1 + d_2), \quad (5)$$

to nie istnieje stan stacjonarny z $V > 0$. Oczywiście nie jest to warunek konieczny, ale jedynie wystarczający, gdyż położyliśmy $L = 1$. Charakteryzuje on jednak zespół parametrów, dla których w ramach rozpatrywanego modelu możliwa jest całkowita likwidacja nowotworu.

Zamieszczony na str. 97 pracy P3 dowód hipotezy, iż $v \neq 0$, aby model dobrze opisywał wyniki doświadczalne, jest, moim zdaniem, nieścisły, gdyż nie bierze pod uwagę faktu, że w funkcji f współczynnik przy b (jako zależny od wielkości a, x, y) może stawać się ujemny i rosnać jak b zmieniając w ten sposób charakter funkcji kwadratowej.

Uwagi końcowe

Mimo tych kilku drobnych krytycznych komentarzy, rozprawę doktorską mgr Julii Grajek oceniam jako bardzo dobrą. Organizacja rozprawy jest wzorowa. Praca składa się ze streszczeń, wstępu ogólnego oraz wprowadzenia do rozdziałów będących przedrukami prac, na których jest oparta. Zarówno we wstępie ogólnym, jak i w rozdziałach poprzedzających publikacje Autorka dokładnie określiła swój wkład w ich powstanie. W przypadku prac P1 i P2 wkład ten jest istotny a nawet dominujący. Praca P3 oparta jest na rezultatach eksperymentalnych, jednak odpowiednia interpretacja danych doświadczalnych była możliwa dopiero w ramach zaproponowanego przez Autorkę modelu matematycznego. W swojej rozprawie Doktorantka jasno sformułowała ogólne i szczegółowe cele swojej działalności naukowej. Wykazała się kulturą matematyczną, dobrym opanowaniem metod statystycznych oraz dużą wiedzą biologiczną, przynajmniej jeśli chodzi o fizjologię komórek nowotworowych. Tekst rozprawy napisany jest płynnym, perfekcyjnym angielskim i w zasadzie nie zawiera błędów edytorskich.

Praca może służyć jako doskonały przykład przydatności modeli matematyczno komputerowych opierających się na danych eksperymentalnych, tak więc matematyki prawdziwie aplikacyjnej. Chociaż eksperymenty 'in silico' w medycynie nie potrafią często

wychwycić wielu istotnych cech modelowanych procesów, to jednak wyznaczają kierunki dalszych badań mających na celu poprawę skuteczności metod terapeutycznych.

Reasumując, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę *Prawo O szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018r. (Dz. U. 2018 poz. 1668). Dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Julii Grajek pt.

”Mathematical modeling of the tumour microenvironment with the aim of studying its heterogeneity as a driver of treatment resistance and a potential therapy target”

oraz dopuszczenie jej do publicznej obrony.



prof. dr. hab. Bogdan Kaźmierczak

