

Prof. dr hab. inż. Piotr Formanowicz
Instytut Informatyki
Politechnika Poznańska
ul. Piotrowo 2, 60-965 Poznań

Poznań, 22 stycznia 2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Julii Grajek pt.

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

Promotor: dr hab. Jan Poleszczuk

I. Problematyka naukowa oraz przedmiot rozprawy

Choroby nowotworowe są jednym z najpoważniejszych wyzwań stojących przed współczesną medycyną i naukami biologicznymi. Jest to stwierdzenie oczywiste, można by rzec, trywialne. Mimo wielu lat intensywnych badań i licznych osiągnięć w zakresie poszukiwania przyczyn powstawania tego typu chorób oraz sposobów ich leczenia i zapobiegania im, nadal stanowią one poważne zagrożenie dla zdrowia i życia coraz większej liczby osób. Przyczyną takiego stanu rzeczy, a przynajmniej jedną z przyczyn, jest fakt, że procesy związane z chorobami nowotworowymi są bardzo złożone i często różnią się między sobą istotnie w zależności od typu nowotworu. Złożoność ich jest coraz lepiej poznawana, nadal jednak daleko jesteśmy od rzeczywistego zapanowania nad nimi.

W ciągu ostatnich trzydziestu lat stało się jasne, że zarówno organizmy żywe, jak i ich funkcjonalne bloki oraz wiele procesów w nich zachodzących są złożonymi systemami i w celu dogłębnego zrozumienia ich natury oraz funkcjonowania niezbędne jest badanie ich jako takie właśnie systemy. Przy podejściu systemowym do badania zjawisk biologicznych (jak i do badania zjawisk innego rodzaju) podstawą jest matematyczny model analizowanego systemu. Za jego pomocą, jeśli dostatecznie dokładnie odzwierciedla on rzeczywistość biologiczną, można w wielu przypadkach odkryć wiele własności analizowanego systemu biologicznego. Badania prowadzone przy użyciu modeli matematycznych są istotnym uzupełnieniem badań laboratoryjnych, a wyniki w ich toku uzyskiwane mogą być wskazówką, co należałoby w laboratorium zbadać i odwrotnie – wyniki laboratoryjne mogą być podstawą do konstrukcji lub modyfikacji modeli.

Zastosowanie podejścia opartego na modelowaniu matematycznym jest szczególnie istotne w przypadku badania procesów nowotworowych, ze względu na wspomnianą wcześniej złożoność oraz trudność weryfikowania niektórych hipotez w badaniach laboratoryjnych lub klinicznych.

Wśród wielu nierozwiązanych dotąd problemów dotyczących nowotworów znajdują się przyczyny nieskuteczności lub niezadowalającej skuteczności stosowanych terapii. Innymi słowy, komórki nowotworowe często wykazują oporność na leczenie, której przyczyny nie zostały do końca poznane. Ich badanie jest niezwykle istotne, gdyż poznanie źródeł oporności może prowadzić do opracowania bardziej skutecznych terapii.

Tego typu zagadnieniami w ramach swoich badań, które zaowocowały przygotowaniem

recenzowanej rozprawy doktorskiej, zajmuje się mgr Julia Grajek. Zastosowała ona modelowanie matematyczne do badania mikrośrodowiska guza nowotworowego w celu poszukiwania źródeł oporności oraz potencjalnych celów terapii kombinowanych.

Rozprawa doktorska mgr Julii Grajek oparta jest na cyklu trzech publikacji, na który składają się następujące artykuły:

- [1] J. Grajek, J. N. Kather, J. Poleszczuk. 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*, 2023, 20, 20220654.
- [2] J. Grajek, J. Poleszczuk. Carbonic anhydrase IX suppression shifts partial response to checkpoint inhibitors into complete tumor eradication: Modelbased investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24, 10068.
- [3] I. Schniewind, W. W. Hadiwikarta, J. Grajek, et al. Cellular plasticity upon proton irradiation determines tumor cell radiosensitivity. *Cell Reports*, 2022, 38, 110422.

II. Analiza treści rozprawy oraz uzyskanych wyników

1. Treść rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Julii Grajek, napisana w języku angielskim, składa się z siedmiu rozdziałów, poprzedzonych listą publikacji Autorki i zestawieniem zastosowanych skrótów oraz ze spisu literatury zamieszczonego na końcu.

Rozdział pierwszy zawiera streszczenie napisane zarówno w języku angielskim, jak i polskim. Jest w nim zwięźle omówiona zawartość kolejnych rozdziałów rozprawy.

Rozdział drugi stanowi wprowadzenie do tematyki rozprawy. Są w nim krótko omówione zjawiska i zagadnienia w niej rozważane. Uzasadniona została potrzeba badania przyczyn oporności na terapie przeciwnowotworowe oraz zasadność skoncentrowania się w takich badaniach na mikrośrodowisku guza nowotworowego i wykorzystania do tego modelowania matematycznego. Omówione zostały wybrane aspekty immunoterapii ze szczególnym uwzględnieniem terapii opartej na inhibitorach punktów kontrolnych oporności. Przedstawiona została potrzeba dalszych badań nad tego typu terapiami. Omówione też zostały zwięźle wybrane biomarkery oraz znaczenie mikrośrodowiska guza nowotworowego w tym kontekście. Krótko została też opisana radioterapia, zarówno tradycyjna, jak i protonowa oraz nowotworowe komórki macierzyste jako potencjalne źródło oporności. Ponadto, zostało krótko opisane zastosowanie modelowania matematycznego do opisu i analizy procesów związanych z powstawaniem i rozwojem nowotworów. Zwrócono m. in. uwagę na modele oddziaływań nowotworu z systemem odpornościowym, modele immunoterapii oraz radioterapii. Omówiono modele oparte na równaniach różniczkowych oraz modele agentowe.

W rozdziale trzecim zostały sformułowane hipotezy oraz cele badawcze. Głównym celem jest zastosowanie modelowania matematycznego do badania heterogeniczności mikrośrodowiska guza nowotworowego jako źródła oporności na terapie antynowotworowe

oraz zbadanie czy wybrane składniki tego mikrośrodowiska mogą być wykorzystane jako potencjalne cele terapii kombinowanych.

Poza celem głównym Autorka rozprawy sformułowała następujące cele szczegółowe:

1. Utworzenie modelu oddziaływań między nowotworem i układem odpornościowym na poziomie pojedynczych komórek w celu zidentyfikowania biomarkerów immunoterapii oraz mechanizmów oporności, które mogłyby być celami terapii kombinowanych.
2. Zbadanie wpływu ekspresji anhidrazy węglanowej IX (CAIX) w nowotworze na rozwój mikrośrodowiska guza nowotworowego oraz efektywność inhibitorów punktów kontrolnych oraz zbadanie możliwości wykorzystania jej jako cel terapii kombinowanych.
3. Zamodelowanie i zbadanie wpływu plastyczności komórek nowotworowych na zróżnicowanie guza nowotworowego oraz skuteczność radioterapii rentgenowskiej i protonowej.

Ponadto Doktorantka sformułowała cztery hipotezy badawcze:

1. Na podstawie modelu, w którym są uwzględnione oddziaływania między nowotworem i układem odpornościowym możliwe jest określenie mechanizmów oporności na leczenie oraz zidentyfikowanie biomarkerów dla terapii opartej na inhibitorach punktów kontrolnych.
2. Ekspresja CAIX w guzie indukuje immunosupresyjne mikrośrodowisko, co powoduje pogorszenie skuteczności inhibitorów punktów kontrolnych i pogarsza jakość biomarkerów takich jak ekspresja PD-L1.
3. W przypadku guzów nowotworowych, w których zachodzi ekspresja CAIX połączenie terapii opartej na inhibitorach punktów kontrolnych z supresją CAIX może prowadzić do polepszenia wyników leczenia.
4. Zastosowanie modelowania matematycznego może przyczynić się do wyjaśnienia różnic między radioterapią rentgenowską i radioterapią protonową, które nie są wyraźnie widoczne w danych eksperymentalnych.

W rozdziale 4 omówione są wyniki przedstawione w publikacji [1]. W ramach badań tam opisanych zaproponowany został model guza nowotworowego oraz jego mikrośrodowiska. Jest to model hybrydowy składający się z modelu agentowego oraz modelu opartego na równaniach różniczkowych cząstkowych. Model agentowy został wykorzystany do symulacji oddziaływania komórek nowotworowych z komórkami układu odpornościowego, natomiast model różniczkowy opisuje substancje obecne w mikrośrodowisku guza. Zaproponowany model agentowy jest istotnym rozszerzeniem modelu znanego z literatury (opracowanego głównie przez Promotora Doktorantki). Za pomocą zaproponowanego modelu hybrydowego Doktorantka badała rolę ekspresji CAIX w terapii opartej na inhibitorach punktów kontrolnych. W szczególności, przeprowadzone zostały symulacje wpływu CAIX na wzrost guza, odpowiedź immunologiczną oraz mikrośrodowisko guza oraz badana była skuteczność terapii łączonej CAIX i PD-1. Analizowana była skuteczność terapii anty-PD-1 w przypadku kilku rodzajów guzów różniących się ekspresją CAIX i PD-L1.

Otrzymane wyniki wskazują, że pacjenci z niską ekspresją PD-L1 przed rozpoczęciem leczenia mogą dobrze reagować na terapię łączoną anty-PD-1 i anty-CAIX.

Rozdział 5 dotyczy wyników opisanych w pracy [2]. Zaproponowany w niej został model oparty na równaniach różniczkowych stanowiący uzupełnienie modelu opisanego w pracy [1]. Bazuje on na wynikach uzyskanych za pomocą wspomnianego modelu. Stanowi on pewne jego uproszczenie. Przy konstrukcji tego modelu założono, że wszystkie substancje w nim uwzględnione znajdują się w stanie równowagi. Ponadto, nie są w nim rozróżnione nowotworowe komórki macierzyste i zwykłe komórki nowotworowe i modelowane są tylko

te pierwsze. Jednak dzięki tym uproszczeniom możliwe było m. in. przebadanie tego modelu w sposób analityczny. Analiza tak uproszczonego modelu wykazała, że inhibicja CAIX może znacząco wpłynąć na jego asymptotyczne zachowanie w ten sposób, że osiągnięty jest stan ustalony bez nowotworu, gdy ekspresja CAIX jest zahamowana, natomiast w przypadku wysokiej początkowej ekspresji CAIX osiągnięty jest stan ustalony z nowotworem, przy czym obserwowany efekt eliminacji nowotworu wymaga silnej odpowiedzi immunologicznej, co potwierdzałoby hipotezę o skuteczności terapii kombinowanej opartej na inhibicji CAIX i wykorzystaniu inhibitorów punktów kontrolnych oporności.

Wyniki uzyskane za pomocą uproszczonego modelu zostały przez Doktorantkę wykorzystane do przeprowadzenia dalszych badań za pomocą modelu wyjściowego (opisanego w artykule [1]). Miały one na celu potwierdzenie pozytywnych efektów otrzymanych w przypadku stosowania terapii kombinowanej opartej na inhibicji CAIX i wykorzystaniu inhibitorów punktów kontrolnych. Przeprowadzone zostały symulacje z uwzględnieniem różnych dawek. Otrzymane rezultaty potwierdziły, że w przypadku guzów, w których zachodzi ekspresja CAIX, terapia kombinowana jest skuteczna, natomiast monoterapie okazują się nieskuteczne. Zaobserwowano też zmniejszenie liczby nowotworowych komórek macierzystych po inhibicji CAIX.

Rozdział 6 poświęcony jest badaniu wpływu tradycyjnej radioterapii promieniami X i radioterapii protonowej na zróżnicowanie guza nowotworowego, a zwłaszcza na plastyczność komórek nowotworowych. Wpływu tego nie można było zauważyć w wynikach eksperymentów *in vitro* przeprowadzonych przez zespół badawczy, w którego pracach Doktorantka uczestniczyła. W związku z tym w celu zbadania tego wpływu zaproponowany został model oparty na równaniach różniczkowych, który został skalibrowany danymi uzyskanymi w badaniach *in vitro* oraz danymi z literatury.

Analizy wykonane za pomocą tego modelu wykazały, że radioterapia protonowa wpływa w mniejszym stopniu na plastyczność komórek nowotworowych niż radioterapia promieniami X. Wyniki te mogłyby w pewnym stopniu wyjaśniać przypuszczalną większą skuteczność radioterapii protonowej w porównaniu z radioterapią promieniami X.

Rozdział 7 zawiera podsumowanie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników. Oprócz podkreślenia ich znaczenia dla głębszego zrozumienia roli mikrośrodowiska guza nowotworowego dla skuteczności terapii antynowotworowych Doktorantka zwróciła uwagę na pewne ograniczenia przeprowadzonych badań oraz wskazała kierunki ewentualnych dalszych badań.

2. Uwagi merytoryczne i redakcyjne

Rozprawa doktorska mgr Julii Grajek napisana jest starannie, z dbałością o jasne przedstawienie zarówno podjętych problemów badawczych, jak i otrzymanych wyników.

Problemy rozważane w rozprawie są niezwykle istotne dla zwiększenia efektywności terapii przeciwnowotworowych. Doktorantka wykazała się umiejętnością konstrukcji modeli agentowych oraz modeli opartych na równaniach różniczkowych i odpowiedniego ich zastosowania do badania procesów biologicznych oraz analizy otrzymanych na ich podstawie wyników. Uzyskane wyniki dotyczące potencjalnej wysokiej skuteczności terapii kombinowanej anty-PD-1 i anty-CAIX, znaczenia ekspresji CAIX i inhibitorów punktów kontrolnych oporności oraz porównania wpływu radioterapii protonowej i radioterapii promieniami X na plastyczność komórek nowotworowych są bardzo interesujące i ważne.

Doktorantka we właściwy sposób skorzystała z literatury przedstawiając stan wiedzy związanej z badanymi w rozprawie zagadnieniami, choć np. zawartość rozdziału zatytułowanego „In silico modeling in oncology” budzi pewien niedosyt.

W rozprawie znalazło się niewiele drobnych błędów językowych. Podane w streszczeniach w językach angielskim i polskim numery rozdziałów nie zgadzają się z rzeczywistymi numerami rozdziałów, gdyż rozprawa zawiera siedem, a nie sześć rozdziałów. Ponadto, w rozdziale 5.2 znalazł się podrozdział opatrzony numerem 5.2.1, jednak jest to jedyny podrozdział w tym rozdziale, więc jego wyodrębnienie nie ma większego sensu (tzn. tekst w nim zawarty powinien znajdować się w rozdziale 5.2, a nie 5.2.1). Podobnie jest w rozdziale 6.2. Są to jednak drobne usterki.

Sformułowane przez Doktorantkę w rozdziale czwartym cele zostały zrealizowane, a postawione hipotezy pozytywnie zweryfikowane.

Autorka rozprawy wskazała pewne ograniczenia przeprowadzonych badań. Wśród nich znalazła się uwaga dotycząca konieczności dalszego potwierdzenia wyników dotyczących znaczenia CAIX dla skuteczności immunoterapii ze względu na ograniczoną dostępność danych. Interesujące byłoby rozwinięcie tej myśli i skomentowanie przez Doktorantkę do jakiego stopnia uważa uzyskane wyniki za zgodne z rzeczywistością biologiczną i na ile dokładnie zaproponowany model tę rzeczywistość opisuje.

3. Podsumowanie

Moim zdaniem mgr Julia Grajek przedstawiła w swojej rozprawie doktorskiej bardzo interesujące wyniki dotyczące zastosowania modelowania matematycznego do analizy procesów związanych z rozwojem i leczeniem chorób nowotworowych, a w szczególności poszukiwania za jego pomocą źródeł oporności oraz potencjalnych celów terapii w mikrośrodowisku guza nowotworowego. Wzbogacają one wiedzę na temat mechanizmów oporności na terapie antynowotworowe oraz potencjalnych celów takich terapii, mogąc się w ten sposób przyczynić do zwiększenia skuteczności leczenia chorób nowotworowych. Warto też zwrócić uwagę na fakt, że wyniki przedstawione w rozprawie zostały opublikowane w trzech bardzo dobrych czasopismach z listy JCR, co świadczy o tym, że badania prowadzone przez Doktorantkę zostały docenione przez środowisko naukowe.

III. Konkluzja

Rozprawa doktorska mgr Julii Grajek zawiera oryginalne i interesujące wyniki naukowe dotyczące badania mikrośrodowiska guza nowotworowego z wykorzystaniem modelowania matematycznego. Moim zdaniem przedstawione w niej wyniki stanowią istotny wkład do dyscypliny inżynieria biomedyczna. Uważam, że wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez obowiązujące przepisy zostały spełnione. Wnoszę zatem o dopuszczenie mgr Julii Grajek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

