



POLITECNICO
MILANO 1863

SCUOLA DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
E DELL'INFORMAZIONE

TESI DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Individuazione di un modello per descrivere le alterazioni della crescita di cellule tumorali in presenza di farmaci citotossici

Relatrice: Prof. Maria Laura Costantino
Correlatrice: Ing. Giustina Casagrande

Autori:

Simone ChangHui LIN	934949
Elena SABATINO	890533
Martina TOSELLI	906815

Anno accademico 2022/2023

Ringraziamenti

Ringraziamo la Professoressa Maria Laura Costantino per l'opportunità; la Professoressa Giustina Casagrande, co-relatrice di questo progetto, per averci seguito lungo tutto il percorso, donandoci consigli e supportandoci in ogni passo del lavoro; l'Ing. Carlo Balsamello per indicazioni sull'implementazione del codice; gli Ing. Melissa Ada Bori e Matteo Carito per la loro disponibilità sulla parte sperimentale.

Sommario

Giorno dopo giorno il cancro continua ad essere la causa di morte di milioni di persone sebbene lo sviluppo di nuovi trattamenti e di farmaci antitumorali che ne dovrebbero permettere la cura.

La chemioterapia è l'approccio più efficiente e, nel caso di tumori liquidi, l'unica terapia consolidata sebbene continui a presentare numerosi effetti collaterali nel lungo termine essendo citotossica anche per le cellule sane.

La ricerca, quindi, ha come obiettivo costante lo sviluppo di nuove terapie per poter ridurre tali conseguenze. A tal proposito, presso il Politecnico di Milano è stata sviluppata una tecnica per l'incapsulamento di farmaco all'interno di globuli rossi e presso l'istituto clinico Humanitas sono in corso test per valutare la cinetica di rilascio della Gemcitabina da parte degli eritrociti.

Risulta utile, quindi, l'individuazione di un modello matematico che sia in grado di rappresentare nel lungo termine l'attività citotossica di un farmaco per una determinata linea cellulare.

L'obiettivo del lavoro è stato riuscire ad individuare un modello appropriato a cellule in vitro in sospensione messe a contatto con farmaci chemioterapici e dimostrare, con opportune simulazioni, che esso sia applicabile ai dati sperimentali forniti, predicendo in maniera adeguata il loro andamento.

Per fare ciò si è partiti da una ricerca bibliografica tramite la quale si sono ottenuti diversi articoli specifici; questi sono stati successivamente classificati in una tabella Excel al fine di poter scegliere quello che descrivesse in maniera più completa il caso oggetto di studio.

Il linguaggio di programmazione Python è stato utilizzato per riprodurre il modello individuato dalla letteratura e per valutare, con diversi test, l'attendibilità dei risultati ottenuti in modo da calcolare sia l'errore qualitativo del modello sia, con un'analisi di sensitività, quali parametri fossero più influenti su di esso.

Infine, si è passati ad applicare il modello su dati sperimentali inerenti alla risposta di cellule OCI-LY19 in presenza di un farmaco citotossico quale la Gemcitabina.

I risultati delle analisi svolte evidenziano che si è riusciti ad individuare e a riprodurre, con un margine di errore relativamente basso, un modello che è in grado di approssimare l'andamento del comportamento temporale di cellule vive.

Allo stesso tempo i test effettuati sui dati sperimentali dimostrano che il modello sembra applicabile per diverse linee cellulari e farmaci dato che riesce a prevedere bene il loro andamento, fornendo risultati attendibili a meno di opportune parametrizzazioni.

In futuro, con le giuste accortezze sui parametri, sarà possibile migliorare ulteriormente la veridicità dei risultati e testare il modello con ulteriori dati sperimentali.

Abstract

To this day cancer is still the leading cause of death, killing millions of people every year, despite the developments of new treatments and antitumoral drugs. Although chemotherapy still has numerous long-term side effects, for example being cytotoxic even for healthy cells, it is to this day the most efficient approach and the only established therapy, especially for liquid tumors.

Therefore, studies are now constantly working on developing new therapies to reduce these consequences. Due to this, a technique for drug encapsulation in red blood cells has been created at the Politecnico di Milano and tests are currently underway at the Humanitas institute clinic to evaluate the kinetic release of Gemcitabine from erythrocytes. Hence, finding a mathematical model that can describe a drug's long-term cytotoxic effect for a particular cell line would be very useful. For this reason, the intent of this work is to identify an existing model from previous studies that is suitable for suspension cell cultures in vitro in contact with chemotherapy drugs and to demonstrate, using appropriate simulations, that it is applicable to provided experimental data, adequately predicting their trend.

To accomplish this, we conducted a scientific literary search that yielded several specific articles, which were then classified using an Excel table so that we could select the one that best described the situation under study. The Python programming language was then used to replicate the identified model and to evaluate the reliability of the results obtained using several tests in order to calculate both the qualitative error of the model and, using a sensitivity analysis, which parameters most impact it.

Finally, we used it on experimental data from a specific cell line (OCI-LY19) in the presence of Gemcitabine, a cytotoxic drug.

From our analysis we were able to find and replicate, with a reasonably low margin of error, a model that can match the temporal behavior pattern of live cells.

Also, tests done on the experimental data show that the model appears applicable for various cell lines and drugs because it can almost accurately predict their trend, providing reliable results unless appropriate parameterizations are made.

In the future, the accuracy of the results can be further improved and the model can be tested using more experimental data with the proper cautions on the parameters.

Indice

Ringraziamenti	I
Sommario	II
Abstract	III
1. Introduzione e contesto di riferimento	3
2. Materiali e metodi	7
2.1. Ricerca bibliografica	7
2.2. Analisi comparativa	7
2.3. Scelta ed implementazione del modello	8
2.4. Calcolo dell'errore qualitativo del modello	10
2.5. Analisi di sensitività	10
2.6. Confronto con i dati sperimentali disponibili	11
2.7. Calcolo dell'errore qualitativo del modello con dati sperimentali	12
3. Risultati	13
3.1. Ricerca bibliografica	13
3.2. Descrizione dei diversi approcci individuati	14
3.2.1. Modello esponenziale	14
3.2.2. Modello logistico	15
3.2.3. Modello di Gompertz	16
3.3. Analisi comparativa generale e scelta del modello	17
3.4. Confronto tra i risultati della letteratura e quelli ottenuti in Python	20
3.5. Analisi di sensitività	25
3.6. Confronto con i dati sperimentali disponibili	28
3.7. Calcolo dell'errore per il tasso di citotossicità ' μAC ' per ogni dose di farmaco	34
4. Discussione: interpretazione dei risultati	38
5. Conclusioni	39
Bibliografia	40
Appendice A	41
Parametri della letteratura su farmaco Citarabina	41
Parametri sperimentali su farmaco Gemcitabina	44
Appendice B	48
Codice Python	48
Lista delle figure	49

1. Introduzione e contesto di riferimento

Il cancro è una malattia in cui alcune delle cellule del corpo crescono in modo incontrollato fino a diffondersi ad altre parti dell'organismo. Normalmente, le cellule umane crescono e si moltiplicano attraverso la divisione cellulare. Quando le cellule invecchiano o si danneggiano, muoiono e altre nuove prendono il loro posto. A volte, questo processo non avviene e le cellule danneggiate crescono e si moltiplicano quando non dovrebbero. Questo porta alla formazione di tumori: grumi di tessuto che possono essere cancerosi, anche definiti maligni, o non cancerosi, ovvero benigni. Quelli cancerosi si diffondono o invadono i tessuti vicini e possono raggiungere zone lontane del corpo per formare nuovi tumori, processo chiamato metastasi, utilizzando la rete vascolare [1].

Il cancro è una malattia genetica, causata da cambiamenti nei geni regolatori del funzionamento cellulare, cambiamenti che possono alterare il modo in cui le cellule crescono e si dividono.

Le cause possono essere ereditarie, errori durante la divisione cellulare o anche danni al DNA causati da sostanze nocive nell'ambiente.

Il corpo normalmente elimina le cellule con DNA danneggiato prima che diventino cancerogene, ma la capacità di fare ciò diminuisce negli anni e questo spiega almeno in parte l'aumento di rischio di cancro con l'avanzare dell'età [1].

Nonostante i progressi compiuti nella comprensione dei meccanismi di insorgenza del cancro e lo sviluppo di sempre nuovi farmaci antitumorali, che ne permettono il controllo e la cura, ancora oggi il cancro è una "minaccia" per l'uomo soprattutto per la sua natura recidiva e per gli effetti collaterali causati da molti dei trattamenti utilizzati per combatterlo.

Secondo lo studio "Global Burden of Disease" pubblicato sul Lancet, vengono diagnosticati circa 2 milioni di nuovi casi ogni anno, rendendolo, così, la seconda causa di morte dopo le malattie cardiovascolari [2].

La domanda che più comunemente ci si pone è: - "Come si combatte il cancro?" -.

Purtroppo, ad oggi non esiste ancora una cura definitiva, ma esistono numerosi trattamenti in funzione della tipologia e dello stato di avanzamento di quest'ultimo.

Tra i più importanti abbiamo [1]:

- la chemioterapia, una tecnica in cui si utilizzano farmaci citotossici per bloccare la crescita di cellule tumorali, portandole a necrosi o inibendone la replicazione;
- l'uso di nanoparticelle, particelle di piccole dimensioni che vengono inoculate con un farmaco chemioterapico e poi somministrate al paziente, diminuendo, così, l'effetto citotossico dato che riescono a distinguere le cellule tumorali dalle sane. Inoltre, le loro proprietà fluorescenti permettono di monitorare l'erogazione del farmaco nei tessuti in tempo reale;
- l'uso di cellule staminali che vengono trapiantate da un donatore per far recuperare la capacità di produzione delle stesse dopo il trattamento radioterapeutico, chemioterapico o ambedue con dosi molto elevate. Tali cellule vengono usate per la loro caratteristica di differenziazione e proliferazione senza

limitazioni, permettendo, quindi, un miglioramento del sistema immunitario del malato e una diminuzione degli effetti collaterali delle altre terapie.

Altre terapie sono [1]:

- l'approccio chirurgico, un trattamento locale che consiste nella rimozione parziale o totale del tumore; esso funziona meglio per tumori solidi contenuti in un'area del corpo e in genere viene usato, in combinazione con la chemioterapia, per rimuovere tumori che causano dolore o pressione al paziente;
- la viroterapia, una tecnica che utilizza un virus modificato in laboratorio in grado di distruggere solamente le cellule tumorali, senza danneggiare le cellule sane;
- l'immunoterapia in cui si utilizzano sostanze prodotte da organismi viventi in grado di riattivare il sistema immunitario del paziente, in maniera tale da riconoscere le cellule tumorali ed annientarle;
- la radioterapia che utilizza alte dosi di radiazioni per uccidere le cellule tumorali e ridurre i tumori, danneggiando il loro DNA con il passare delle settimane.

Dai risultati sperimentali, è emerso che la chemioterapia sia attualmente la tecnica più affidabile ed efficiente per combattere il cancro. Viene usata sia per ridurre le dimensioni del tumore pre-intervento chirurgico, e/o eliminare in parte o totalmente le cellule tumorali rimanenti dopo l'intervento ed è utilizzabile in combinazione con altre terapie migliorandone l'esito. Nel caso di tumori liquidi è attualmente l'unica strategia consolidata, anche se si stanno sperimentando nuovi approcci terapeutici.

Tale terapia ha successo se [3]:

- i farmaci possiedono attività antitumorale intrinseca, meccanismi d'azione differenti ed effetti tossici non sovrapponibili;
- dosaggio e regime di somministrazione sono ottimizzati;
- l'intervallo tra le somministrazioni di farmaco è il più breve possibile.

Questo trattamento, tuttavia, presenta numerosi effetti collaterali a lungo termine per la sua non selettività verso le cellule tumorali, risultando, così, citotossico anche per le cellule sane.

La ricerca, quindi, è indirizzata allo sviluppo di nuove terapie per poter ridurre tali conseguenze.

Interessanti in termini farmacologici sono i nuovi tentativi di rilascio graduale di farmaco nel tempo, in contrasto con il tradizionale rilascio a bolo. Tra i vari carrier possibili sono stati identificati i globuli rossi, cellule autologhe del paziente, e dunque in grado di non indurre reazioni avverse [1].

Presso il Politecnico di Milano è stata sviluppata una tecnica innovativa per l'incapsulamento di farmaco all'interno di globuli rossi sfruttando sollecitazioni microfluidiche [4]. Il passaggio delle cellule all'interno di microcanali è in grado di indurre la deformazione meccanica della membrana cellulare con l'applicazione di sforzi di taglio localizzati; in questo modo si ha l'apertura di porosità temporanee che permettono la diffusione delle molecole di farmaco nei globuli rossi.

Una delle patologie in cui un simile approccio terapeutico potrebbe dare grandi vantaggi, è il Linfoma Diffuso a Grandi Cellule B (DLBCL), la forma più comune di linfoma non-Hodgkin (NHL), molto aggressivo.

Presso l'istituto Clinico Humanitas, in collaborazione con il Politecnico di Milano, sono attualmente in corso test per la valutazione della cinetica di rilascio di Gemcitabina previamente incapsulata in globuli rossi. La Gemcitabina nello specifico è un agente chemioterapico utilizzato per trattare ricadute o forme refrattarie di DLBCL. Per determinare l'entità del rilascio di Gemcitabina da parte dei globuli rossi si utilizza una misura indiretta, che consente di associare tale rilascio ad alterazioni della mortalità cellulare. Si utilizzano infatti analisi citofluorimetriche, previa marcatura delle cellule tumorali con orme fluorescenti di Annexina V e Propidio Iodide. Per determinare l'effettiva concentrazione di farmaco all'interno del pozzetto di coltura si utilizzano inoltre cellule "di controllo" poste in contatto con concentrazioni note di farmaco libero.

Tra i principali limiti di questo approccio si identificano:

- la sovrapposizione nel tempo della mortalità indotta dal farmaco con quella causata da una riduzione della concentrazione di nutrienti disponibili nel medium di coltura ed essenziali per la linea cellulare;
- l'impossibilità di prolungare la prova per tempi superiori alle 96h (che non consente il rilascio completo del farmaco da parte dei globuli rossi);
- la difficoltà nel valutare, nei risultati ottenibili con la citometria a flusso, l'effetto citotossico del farmaco rilasciato, in parte mascherato dalla proliferazione della popolazione cellulare sopravvissuta. Un'informazione mancante è il numero di cellule presenti nei campioni ad ogni istante temporale intermedio.

È dunque evidente l'utilità di un modello analitico in grado di rappresentare l'attività citotossica di un farmaco con parametri opportunamente calibrati per la Gemcitabina e per la linea cellulare utilizzata nello studio (OCI-LY19). È inoltre da osservare che tali cellule hanno la caratteristica di proliferare in sospensione, si porrà quindi attenzione all'individuazione di modelli appropriati.

Il primo passo da fare sarà quindi l'individuazione di un modello che permetta di descrivere la numerosità delle cellule in ogni istante temporale, in diverse condizioni sperimentali. Si avrà in questo modo la possibilità di isolare l'effetto del farmaco e quantificarne l'azione sia in termini di mortalità sia di inibizione della crescita cellulare. Un modello robusto permetterà anche di estendere, almeno in parte, la previsione a tempi maggiori di quelli oggi considerati.

Ci si concentrerà, quindi, sull'analisi di modelli che utilizzano cellule in vitro: verrà studiato il comportamento di cellule in sospensione messe a contatto con farmaci citotossici.

Gli effetti dei farmaci sulle cellule possono essere molteplici, la citotossicità degli stessi può [3]:

- variare in base alla fase del ciclo cellulare;
- essere proporzionale all'esposizione del farmaco;
- essere non selettiva.

I farmaci che sappiamo essere stati valutati nel contesto applicativo di riferimento, per il trattamento di DLBCL, sono Gemcitabina, Citarabina (ARA-C), Metotrexato (MTX) e Doxorubicina (Doxo).

Le molecole di Gemcitabina promuovono l'apoptosi delle cellule cancerose in fase di sintesi del DNA. In generale tale farmaco agisce uccidendo tutte le cellule in fase di divisione. Dato l'elevato tasso di divisione delle cellule cancerose, queste ultime sono bersagliate dalla Gemcitabina in misura maggiore rispetto alle cellule sane [5].

La Citarabina e il Metotrexato appartengono alla categoria dei chemioterapici antimetaboliti, molto simili alle normali sostanze presenti all'interno della cellula. Gli antimetaboliti si mascherano da basi azotate purine o pirimidine e, quando vengono incorporati dalle cellule, diventano i mattoni del DNA, impedendo così la normale divisione cellulare. Gli antimetaboliti sono specifici per il ciclo cellulare; in questo caso agiscono principalmente sulla fase "S" del ciclo cellulare, dove la cellula duplica il proprio DNA [6]. Infatti, la Citarabina agisce attraverso il danno diretto al DNA e l'incorporazione nel DNA e ha anche proprietà antivirali e immuno-soppressorie [5].

La Doxorubicina, invece, è un farmaco chemioterapico di tipo antraciclina che danneggia le cellule tumorali rallentando o inibendo la loro crescita, bloccando un enzima necessario per la divisione. Inibisce, quindi, la proliferazione nella fase G2/M del ciclo cellulare, dove la cellula si prepara alla divisione cellulare che avviene poi nella fase M [6], [7].

Come detto in precedenza, dato che tutti i farmaci chemioterapici comportano numerosi effetti collaterali anche nel medio-lungo termine, la ricerca investe molto sforzo per migliorare l'efficacia dei trattamenti attuali e per svilupparne di nuovi sempre più ottimizzati e, quando possibile, personalizzati [3].

Allo stesso tempo i modelli matematici continuano ad essere una componente importante della ricerca, aiutando a descrivere la risposta delle cellule tumorali ai diversi regimi di trattamento, siano essi somministrati in vivo o in vitro. [6]

Questo lavoro parte da una approfondita ricerca bibliografica volta ad individuare un modello matematico adatto a descrivere le alterazioni nella riproduzione delle cellule tumorali in vitro, in sospensione, in presenza ed assenza di farmaci chemioterapici.

Una volta individuate opportune equazioni per modellizzare tale crescita, il modello verrà implementato tramite il linguaggio di programmazione Python. Alcune simulazioni preliminari saranno effettuate utilizzando sia dati estratti dalla letteratura, che dati sperimentali.

2. Materiali e metodi

Basandosi sulle osservazioni disponibili e al fine di capire al meglio l'argomento che verrà trattato, è necessaria inizialmente un'approfondita ricerca bibliografica, seguita da un'analisi comparativa tra i diversi articoli trovati al fine di arrivare alla scelta di un opportuno modello, di cui sia possibile l'implementazione.

L'attendibilità dei risultati ottenuti è stata valutata calcolando l'errore di scostamento, rispetto alla letteratura; in seguito, è stata effettuata un'analisi di sensitività sui parametri di modello per capire l'influenza di ognuno di essi sui risultati.

Infine, si è provato ad effettuare una prima stima dei parametri incogniti nel caso specifico di studio, sfruttando alcuni dati sperimentali disponibili.

2.1. Ricerca bibliografica

Il primo passo è stato effettuare una ricerca bibliografica facendo uso di diverse fonti e banche dati come Scopus, Google Scholar e PubMed dai quali ricavare un numero soddisfacente di articoli pertinenti.

Sono stati, poi, consultati siti di divulgazione scientifica e medica come quello del *National Cancer Institute* [1] e della *World Health Organization* [8] con l'obiettivo di avere una panoramica sui tumori come malattia.

Inoltre, per inquadrare meglio il progetto, è risultata utile la lettura del brevetto "*Red blood cells for drug delivery*" [4] in cui l'invenzione descritta consiste in un metodo per introdurre sostanze all'interno dei globuli rossi; nella pratica clinica o nella ricerca sperimentale tali composti possono essere DNA, RNA, molecole inorganiche utilizzate a scopo terapeutico, come ad esempio nel trattamento dei tumori.

Il punto di partenza è stato proprio il titolo del progetto, da cui sono state estratte le keywords più adeguate: "*modello matematico*", "*cellule tumorali*", "*citotossico*".

Queste sono state inserite in inglese su Scopus facendo uso anche dell'operatore logico "*or*" tra "*tumor*" e "*cancer*" al fine di poter includere sia articoli che parlassero di cellule tumorali in generale, sia articoli sulle cellule propriamente cancerogene.

Sono stati ottenuti, così, un certo numero di documenti, sono poi stati selezionati solo quelli che studiano gli effetti del farmaco sulle cellule tumorali per tempi almeno superiori alle 48 ore.

Per meglio selezionare questo genere di articoli è stata inserita nella ricerca anche una nuova keyword: "*long-term*". Il passaggio successivo è stato raffinare ulteriormente gli articoli con l'aspettativa di arrivare a un numero gestibile di documenti da analizzare.

2.2. Analisi comparativa

Al termine della lettura degli articoli selezionati, è stata effettuata tra di essi un'analisi comparativa servendosi di una tabella Excel in cui sono state introdotte le informazioni

relative alle diverse pubblicazioni, così da classificare gli articoli in modo opportuno, evidenziandone punti di contatto e differenze.

Nello specifico i parametri di confronto sono stati

- Equazioni riguardanti la dinamica delle cellule tumorali e/o sane;
- Equazioni riguardanti la cinetica del farmaco, scritte in modo esplicito o implicito;
- Ipotesi sulla forma delle equazioni quali crescita logistica (CL), modello di Gompertz (G), modello esponenziale (E);
- Vincoli e ipotesi di progetto quali “in vitro” e condizioni al contorno delle equazioni;
- Tipologia e fase del tumore, solido (S) o liquido (L), e linea cellulare utilizzata per lo studio di esso;
- Parametri di inizializzazione e parametri riguardanti la vitalità delle cellule e le proprietà del farmaco, come il numero di cellule vive o morte (NT), sia per effetto del farmaco (MF) sia per apoptosi o necrosi (MN); la concentrazione del farmaco (CF) e la sua capacità di trasporto (GM);
- Tipologia di farmaco studiato: Gemcitabina, Citarabina (ARA-C), Doxorubicina (Doxo), Metotrexato (MTX);
- Tempo di coltura cellulare al fine di rilevare gli effetti nel lungo termine.

Per alcuni parametri è stata fatta anche un'analisi statistica di base per valutarne la frequenza di distribuzione nel piccolo campione studiato.

2.3. Scelta ed implementazione del modello

L'obiettivo della comparazione era la ricerca di un'equazione di partenza e di eventuali altre equazioni che possano descrivere in modo completo il fenomeno oggetto di interesse, valutando anche quali siano le ipotesi plausibili e quali i parametri da tenere in considerazione.

Bisognerà considerare solo il numero di cellule nel tempo e non come si vanno a disporre nello spazio (ad esempio come si espande la massa tumorale nel corpo), in modo da poter individuare una serie di equazioni che possano descrivere il comportamento di cellule tumorali a contatto con farmaci citotossici trasportati da globuli rossi in vitro considerando solo le dinamiche temporali e la numerosità di tali cellule.

Oggetto di studio saranno in particolare le equazioni inerenti alla dinamica riproduttiva delle cellule vive, delle cellule morte e la concentrazione del farmaco.

È, inoltre, importante trovare un modello in cui sia possibile cambiare i parametri in base al tipo di cancro preso in esame, in modo da poter descrivere una dinamica biologicamente realistica.

Dall'analisi della letteratura si è visto che Guzev considera un modello che utilizza tre variabili per descrivere il sistema sperimentale in vitro: le cellule tumorali vive, A ; le cellule tumorali morte, A_d ; le molecole del farmaco (concentrazione), C . Le equazioni saranno rispettivamente [9], [10]:

$$\frac{dA}{dt} = rA \left(1 - \frac{A}{K}\right) - \mu_A A A_d - \frac{\mu_{AC} AC}{a + C}$$

$$\frac{dA_d}{dt} = \mu_A A A_d - d A_d + \frac{\mu_{AC} AC}{a + C}$$

$$\frac{dC}{dt} = -\mu_C C - \frac{\mu_{CA} CA}{a + C}$$

$\frac{dA}{dt}$ indica la dinamica delle cellule tumorali vive. Tale equazione è costituita da tre componenti: una positiva, che si riferisce alla crescita logistica del tumore, caratterizzata dal coefficiente r e limitata dal numero massimo di cellule tumorali K ; una negativa, che corrisponde alla morte delle cellule vive con il tasso μ_A ; nell'ultimo termine negativo μ_{AC} è il tasso di morte risultante dall'azione del farmaco sulle cellule tumorali e cambia a seconda del particolare farmaco e della dose.

$\frac{dA_d}{dt}$ rappresenta la dinamica delle cellule A20 morte: in essa il primo e l'ultimo termine sono positivi e rappresentano la morte delle cellule tumorali con un coefficiente di velocità μ_A dovuto all'apoptosi o alla necrosi e dipendono dalle cellule tumorali vive che competono per la sopravvivenza (consumo di ossigeno e nutrizione) in uno spazio chiuso e da quelle che sono passate da vive a morte sotto l'influenza dei farmaci; il termine negativo corrisponde alla dissoluzione delle cellule morte con il tasso d .

$\frac{dC}{dt}$ esprime la farmacocinetica di primo ordine di un farmaco in cui $C(0)$ è un valore costante; dt dipende dalla dose del farmaco, poiché è stata somministrata una sola volta all'inizio dell'esperimento; μ_C è il tasso di smaltimento del farmaco.

Supponendo che ci siano 10-100 molecole di farmaco che attaccano ogni cellula tumorale, viene scelto che il parametro μ_{CA} debba essere dieci volte superiore a μ_{AC} .

Infine, il parametro a rappresenta la concentrazione di farmaco che produce il 50% dell'attività massima del farmaco in ogni popolazione cellulare.

Il modello contiene nove parametri e le condizioni iniziali a $t = 0$ devono essere:

$A(0)$: concentrazione iniziale cellule A20 vive $\left[\frac{\text{cellule}}{\text{mL}}\right]$	$A_d(0)$: concentrazione iniziale cellule A20 morte $\left[\frac{\text{cellule}}{\text{mL}}\right]$
$5 \cdot 10^4$	2.500
$1 \cdot 10^4$	500
$5 \cdot 10^3$	250

dove $A_d(0)$ è pari ad almeno il 5% di $A(0)$ e la concentrazione iniziale di farmaco è pari a

$$C(0) = \text{dose } (\mu\text{M}) \cdot 6 \cdot 10^{14} \left[\frac{\text{numero molecole del farmaco}}{\text{mL}} \right].$$

Il numero di molecole di farmaco viene calcolato utilizzando l'espressione $\frac{m \cdot Na}{M}$ in cui m è la massa del farmaco (kg); Na è il numero di Avogadro pari a $6,022 \cdot 10^{23}$ (costante); M è la massa molare del farmaco. Inoltre, il coefficiente r , indicante il tasso di crescita, viene ricavato per ogni concentrazione tramite la formula [9], [10]:

$$r = \frac{\ln\left(\frac{N(t)}{N(0)}\right)}{t}$$

dove $N(t)$ indica il numero di cellule al tempo t e $N(0)$ il numero di cellule al tempo $t = 0$. Considerando, infatti, il grafico dell'autrice descritto dalla Figura 10, si può vedere che per $N(0) = 12 \cdot 10^4$ alla 84esima ora, $N(t) = 349 \cdot 10^4$ alla 132esima ora e $t = 132 - 84 = 48$ ore:

$$r = \frac{\ln\left(\frac{3.490.000}{120.000}\right)}{48} = 0,07 \quad (\text{ore}^{-1}).$$

In seguito, al fine di verificare l'attendibilità di tale modello, sono stati effettuati diversi test preliminari su Python, linguaggio di programmazione scelto per la sua documentazione estensiva e per la licenza Open Source, in modo che possano essere testati facilmente i risultati.

È stata utilizzata la libreria *NumPy* per il calcolo numerico e *Matplotlib* per la rappresentazione di grafici e la funzione *solve_ivp*, appartenente alla libreria *SciPy*, per la risoluzione di equazioni differenziali ordinarie. Il primo passo è stato utilizzare i dati presenti negli articoli, implementando un codice per il modello senza farmaco nel lungo termine, confrontando, poi, il grafico ottenuto con quello della letteratura. I valori del coefficiente r per ogni concentrazione iniziale sono stati trovati con l'interpolazione dei dati sperimentali mediante la funzione *scipy.interpolate.interp1d*.

Una volta individuato il modello più promettente dall'analisi di letteratura, come sopra descritto, ci si è concentrati sull'implementazione dello stesso e ancor prima sulla comprensione approfondita del significato dei parametri in esso inclusi.

2.4. Calcolo dell'errore qualitativo del modello

Successivamente, per un'analisi più accurata, è stato calcolato, tramite un ulteriore test, l'errore qualitativo, si è ovvero valutato di quanto si discostassero i risultati ottenuti da quelli della letteratura, nel caso in cui non fosse presente l'effetto del farmaco. Gli stessi test sono stati poi effettuati anche considerando l'azione del farmaco nel breve termine, situazione in cui si ha una buona numerosità di dati.

2.5. Analisi di sensitività

Per comprendere al meglio gli effetti delle variazioni degli input o dei parametri interni al modello sui risultati dello stesso, è stata effettuata un'analisi di sensitività.

Nello specifico sono stati modificati i parametri di ingresso, per poter tracciare l'andamento del grafico del numero di cellule tumorali presenti, in funzione del tempo, in diverse situazioni sperimentali.

Tale analisi è stata fatta senza considerare l'effetto del farmaco, in modo da poter innanzitutto migliorare la descrizione della dinamica di replicazione delle specifiche cellule, dapprima nel lungo termine e conseguentemente nel breve termine.

Tali azioni permettono di migliorare la comprensione della risposta del modello e anche di poter migliorare la robustezza delle valutazioni finali.

2.6. Confronto con i dati sperimentali disponibili

Altri test sono stati effettuati utilizzando opportuni dati sperimentali inerenti alla risposta di cellule di linea di Linfoma Non-Hodgkin a grandi cellule B (DLBCL), denominate OCI-LY19, in presenza di una sostanza citotossica quale la Gemcitabina.

Tali dati sono stati ottenuti da un esperimento che ha come obiettivo la valutazione in vitro del rilascio di farmaco nel tempo, da parte di eritrociti caricati, secondo le modalità descritte nel brevetto sopra-citato. Lo studio è effettuato in apposite piastre di coltura da 12 pozzetti, inserendo appositi inserti polimerici di tipo transwell nei pozzetti, così da permettere la co-cultura di cellule tumorali e globuli rossi, nonché il contatto del farmaco rilasciato dai rossi con le cellule tumorali, in quanto esso può diffondere tramite la membrana dell'inserto.

Essendo impossibile con gli strumenti a disposizione una quantificazione diretta della dose di farmaco rilasciato, si è optato per una misura indiretta basata sulla quantificazione della mortalità cellulare nei pozzetti oggetto di co-cultura e il confronto dello stesso parametro in pozzetti contenenti una concentrazione nota di farmaco.

La valutazione dell'effetto citotossico del farmaco viene effettuata sia al variare della concentrazione sia nel tempo.

Le concentrazioni di farmaco considerate sono $0,3 \frac{ng}{mL}$; $0,5 \frac{ng}{mL}$; $2 \frac{ng}{mL}$; $5 \frac{ng}{mL}$; $10 \frac{ng}{mL}$ che in μM diventano rispettivamente:

$$1,14 \cdot 10^{-3} \mu M; 1,90 \cdot 10^{-3} \mu M; 7,60 \cdot 10^{-3} \mu M; 1,90 \cdot 10^{-2} \mu M; 3,80 \cdot 10^{-2} \mu M.$$

L'esperimento valuta l'azione del farmaco nel tempo considerando i seguenti intervalli di tempo: 24, 48, 72, 96 ore. In ogni istante temporale sono valutati due diversi campioni per ogni condizione di prova, così da valutare la ripetibilità della procedura.

Ai campioni con il farmaco sono affiancati tre campioni "controllo" che sono utili per valutare la vitalità di cellule non trattate durante l'esperimento e per il settaggio dei parametri del citometro a flusso (o citofluorimetro), utilizzato in fase di acquisizione dei dati.

Le cellule vengono seminate in pozzetti con un volume di $1.5 mL$ ad una densità di $100.000 \frac{cellule}{mL}$. Il volume totale di semina comprende il farmaco, se è presente, le cellule e il terreno.

I dati inerenti alla Gemcitabina sono stati ricavati da specifici siti [11], [12], ad eccezione del parametro relativo al tasso di smaltimento del farmaco μ_c che è stato opportunamente calcolato come [9], [10]

$$\mu_c = \frac{\ln(2)}{t_{\frac{1}{2}}} \quad [ore^{-1}]$$

dove $t_{\frac{1}{2}}$ indica la metà del tempo massimo in cui viene smaltito il farmaco: la Gemcitabina viene smaltita tra i 42-94 minuti, ovvero 0,7-1,57 ore [12].

Allo stesso tempo, per i parametri non trovati è stata effettuata un'analisi di sensitività, senza considerare l'effetto del farmaco, al fine di individuare quelli più adeguati alla riuscita del modello; sono stati, quindi, considerati nuovamente i valori dei parametri utilizzati in letteratura per poterli man mano modificare.

2.7. Calcolo dell'errore qualitativo del modello con dati sperimentali

Infine, anche per i dati sperimentali, come fatto con quelli della letteratura, è stato calcolato l'errore qualitativo per il tasso di citotossicità μ_{AC} per ogni dose di farmaco nel seguente modo

$$\% \text{ Errore} = \frac{\text{Errore simulazione} - \text{Errore reale}}{\text{Errore reale}} \cdot 100$$

al fine di vedere di quanto si discostassero i risultati delle diverse simulazioni dall'andamento reale dei dati sperimentali.

3. Risultati

3.1. Ricerca bibliografica

Dalla ricerca effettuata su Scopus con le parole chiave “tumor or cancer” si sono ottenuti 5.378.736 documenti, aggiungendo “and cell” si è passati a 2.621.706 risultati e inserendo man mano anche “and model”, “and mathematical”, “and cytotoxic”, “and long-term” si sono ottenuti rispettivamente 604.500 documenti, 11.711 documenti, 556 documenti ed infine 28 articoli utili.

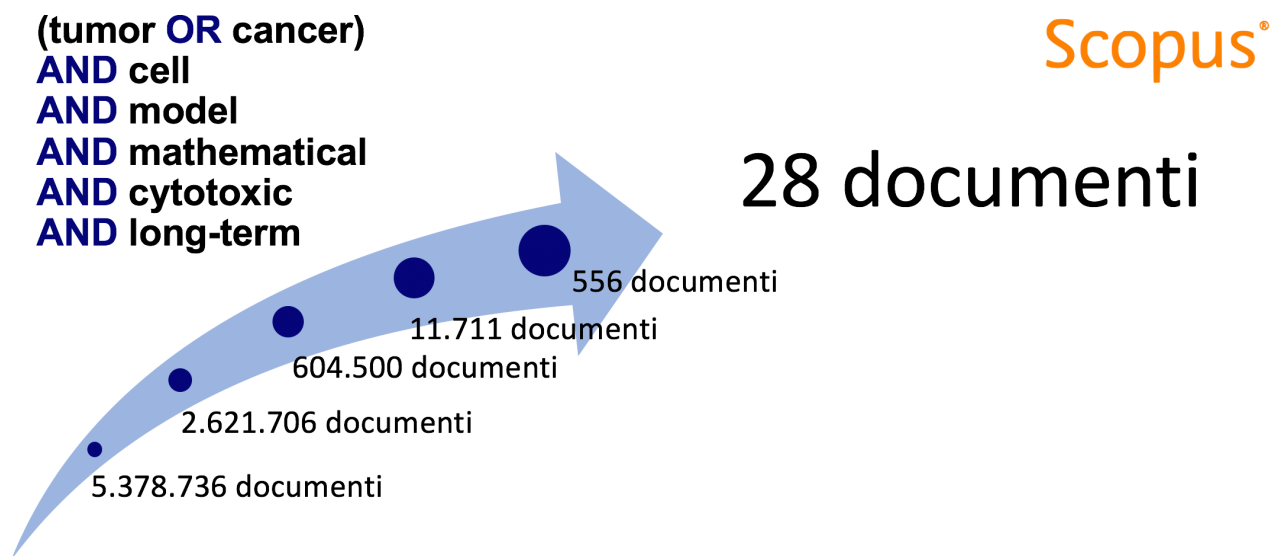


Figura 1. Scrematura articoli trovati in seguito all'inserimento delle parole chiave.

Da questi sono state escluse le review, per le poche informazioni specifiche trovate in esse, e articoli che trattassero terapie combinate tra loro. Si è arrivati, così, a soli 15 articoli che sono stati comparati al fine di estrapolare i dati opportuni da poter inserire nella tabella Excel.

Dalla lettura dei vari articoli è emerso che, sebbene non esista una guida chiara su come scegliere il modello più appropriato, ne vengono proposti diversi. Alcuni di questi sono utilizzati in modo diffuso nella letteratura scientifica, e individuano un sistema di equazioni differenziali ordinarie (ODE), che permettono di descrivere la crescita del tumore.

Un simile approccio può essere utile per fare previsioni sull'efficacia dei trattamenti contro il cancro [13]–[15]:

- Modello esponenziale;
- Modello logistico;
- Modello di Gompertz.

Effettuando un'analisi descrittiva sulla tipologia di modello utilizzato nei 15 articoli selezionati è emerso che il modello esponenziale e quello di Gompertz vengono utilizzati in circa l'11% degli articoli individuati, mentre nel 67% dei casi si propone la crescita

logistica come modello ottimale ed infine in un altro 11% degli articoli non si definisce a priori l'approccio, ma viene sviluppato un sistema di equazioni specifico.

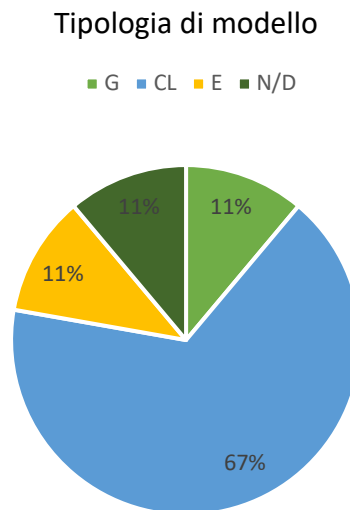


Figura 2. Grafico a torta che mostra la tipologia di modello trovato.

3.2. Descrizione dei diversi approcci individuati

Per capire al meglio i diversi modelli identificati in letteratura, iniziamo a guardare l'equazione generale per il tasso di crescita di una popolazione che cambia in base al numero di individui della popolazione nel tempo [13]:

$$\frac{dN}{dt} = r \cdot N$$

In essa $\frac{dN}{dt}$ è il tasso di crescita della popolazione in un dato istante, N indica la popolazione, t il tempo e r il tasso di crescita per capita, ovvero quanto velocemente ogni cellula si duplica.

Tale equazione è molto generale e si può rendere più specifica per descrivere due differenti tipologie di modelli di crescita: quando il tasso di crescita cellulare si mantiene costante e positivo indipendentemente dalla grandezza della popolazione, allora si parla di crescita esponenziale; quando, invece, il tasso di crescita pro-capite decresce quando la popolazione aumenta verso un limite massimo, si parla di crescita logistica.

3.2.1. Modello esponenziale

Nel modello esponenziale il tasso di crescita della popolazione aumenta nel tempo in proporzione alla grandezza della popolazione.

Nelle prime fasi della crescita del tumore le cellule si dividono regolarmente, creando due cellule figlie ogni volta. Una descrizione naturale delle prime fasi della crescita del cancro è quindi il modello esponenziale, dove la crescita è proporzionale alla popolazione.

$$\frac{dV}{dt} = a V$$

La costante di proporzionalità a indica il tasso di crescita del tumore mentre V rappresenta la massa tumorale [13].

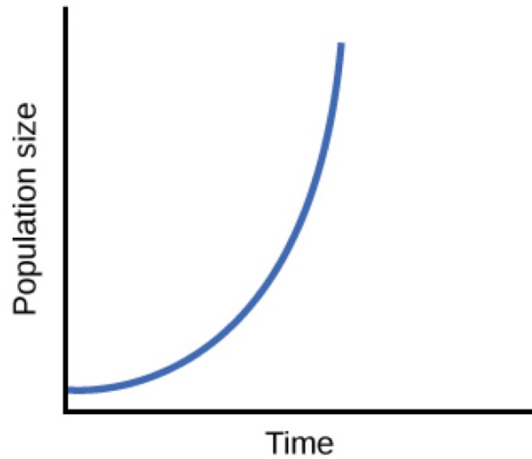


Figura 3. Grafico che mostra la crescita esponenziale di una popolazione nel tempo.

Questo modello è stato spesso utilizzato nell'analisi precoce delle curve di crescita del tumore e sembra funzionare abbastanza bene nel prevedere la crescita precoce solo per un breve arco temporale.

Un modello matematico di questo tipo non è biologicamente realistico perché in natura le popolazioni crescono esponenzialmente, ma tale crescita è man mano limitata dalla scarsa reperibilità di risorse che l'ambiente circostante offre.

È per questo, quindi, che si ritiene tale modello esponenziale della crescita tumorale un modello ideale.

3.2.2. Modello logistico

Questo modello descrive la crescita di una popolazione limitata da una capacità di carico ("carrying capacity") b che indica la massima densità di cellule tumorali (massima dimensione possibile del tumore).

$$\frac{dV}{dt} = a V \left(1 - \frac{V}{b}\right)$$

L'equazione logistica presuppone che il tasso di crescita a diminuisca linearmente all'aumentare delle dimensioni del tumore fino a raggiungere lo zero in corrispondenza della capacità di carico.

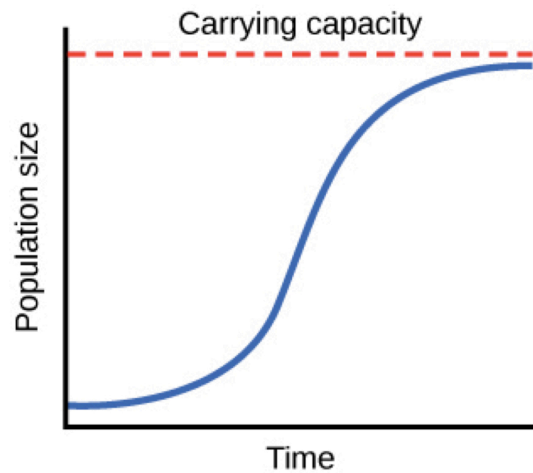


Figura 4. Grafico che mostra la crescita logistica di una popolazione nel tempo.

Riscrivendo l'equazione avremo

$$\frac{dV}{dt} = a V \left(\frac{b - V}{b} \right)$$

Da quest'ultima deduciamo che in un qualsiasi momento della crescita di una popolazione l'espressione $(b - V)$ indica il numero di individui che possono essere aggiunti alla popolazione prima che raggiunga la capacità di carico [13].

L'intero termine $\frac{(b-V)}{b}$ rappresenta la capacità di carico che non è ancora stata "consumata"; più essa viene "consumata" più il termine ridurrà il tasso di crescita.

Quando la popolazione è di piccole dimensioni, avremo $V \ll b$; il termine $\frac{(b-V)}{b}$ diventa approssimativamente 1, restituendoci l'equazione del modello esponenziale. Questo si adatta proprio al grafico del modello logistico illustrato sopra: la popolazione cresce in modo quasi esponenziale all'inizio, ma si stabilizza sempre di più man mano che si avvicina alla carrying capacity; infine, il punto temporale in cui il tasso di crescita è massimo si verifica dopo il raggiungimento della metà della crescita possibile.

3.2.3. Modello di Gompertz

L'equazione di Gompertz, a differenza del modello logistico, ipotizza un tasso di crescita esponenzialmente decrescente e il punto temporale in cui quest'ultimo risulta massimo si verifica dopo il raggiungimento del 37% delle dimensioni finali.

$$\frac{dV}{dt} = a V \ln \frac{b}{(V + c)}$$

Rispetto al modello logistico, quello di Gompertz arresta la crescita più rapidamente finché la popolazione non si avvicina alla capacità di carico ed è stato riconosciuto da tempo come un modello ragionevole per tumori solidi [13].

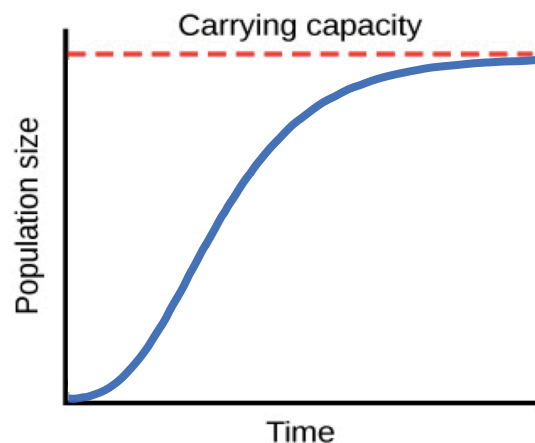


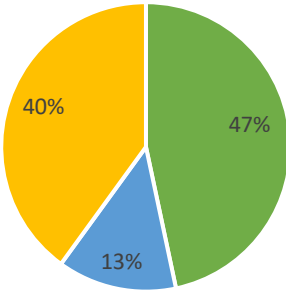
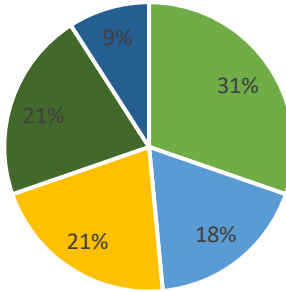
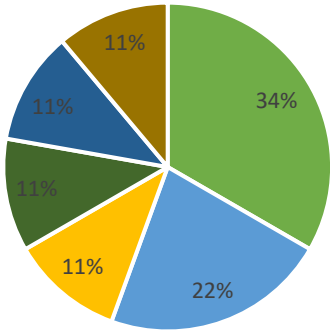
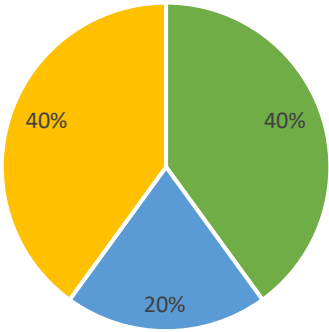
Figura 5. Grafico che mostra la crescita secondo l'equazione di Gompertz di una popolazione nel tempo.

3.3. Analisi comparativa generale e scelta del modello

Dall'analisi dei dati contenuti nella tabella utilizzata per l'analisi comparativa è emerso che

- solo il 13% degli articoli individuati tratta di tumori liquidi (40% solidi, 47% forma del tumore non definita);
- i parametri considerati indicano nel 31% dei casi il numero di cellule tumorali, nel 21% sia la mortalità del farmaco, sia la grandezza massima del tumore, nel 18% la concentrazione del farmaco e nel 9% la morte naturale delle cellule;
- il farmaco più studiato a livello modellistico risulta la Doxorubicina (34%), seguita dalla
- Citarabina (22%) e da altri quattro farmaci all'11%;
- il modello del farmaco è descritto nel 40% degli articoli tramite un'equazione differenziale implicita, nel 20% esplicita e in un altro 40% non viene definita alcuna equazione, ma si ha piuttosto una analisi qualitativa.

Di seguito, nelle figure 5-8, la rappresentazione grafica di tali distribuzioni.

<p>Forma del tumore</p> <p>■ S ■ L ■ N/D</p>  <table border="1"> <thead> <tr> <th>Forma del tumore</th> <th>Percentuale</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>S</td> <td>47%</td> </tr> <tr> <td>L</td> <td>13%</td> </tr> <tr> <td>N/D</td> <td>40%</td> </tr> </tbody> </table>	Forma del tumore	Percentuale	S	47%	L	13%	N/D	40%	<p>Parametri considerati</p> <p>■ NT ■ CF ■ MF ■ GM ■ MN</p>  <table border="1"> <thead> <tr> <th>Parametri considerati</th> <th>Percentuale</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NT</td> <td>31%</td> </tr> <tr> <td>CF</td> <td>18%</td> </tr> <tr> <td>MF</td> <td>21%</td> </tr> <tr> <td>GM</td> <td>21%</td> </tr> <tr> <td>MN</td> <td>9%</td> </tr> </tbody> </table>	Parametri considerati	Percentuale	NT	31%	CF	18%	MF	21%	GM	21%	MN	9%		
Forma del tumore	Percentuale																						
S	47%																						
L	13%																						
N/D	40%																						
Parametri considerati	Percentuale																						
NT	31%																						
CF	18%																						
MF	21%																						
GM	21%																						
MN	9%																						
<p><i>Figura 6. Grafico a torta che mostra la forma del tumore studiato negli articoli.</i></p>	<p><i>Figura 7. Grafico a torta che mostra i parametri considerati negli articoli.</i></p>																						
<p>Farmaco utilizzato</p> <p>■ Doxo ■ ARA-C ■ Ibr ■ NGQD ■ Chl ■ Mel</p>  <table border="1"> <thead> <tr> <th>Farmaco utilizzato</th> <th>Percentuale</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Doxo</td> <td>34%</td> </tr> <tr> <td>ARA-C</td> <td>22%</td> </tr> <tr> <td>Ibr</td> <td>11%</td> </tr> <tr> <td>NGQD</td> <td>11%</td> </tr> <tr> <td>Chl</td> <td>11%</td> </tr> <tr> <td>Mel</td> <td>11%</td> </tr> </tbody> </table>	Farmaco utilizzato	Percentuale	Doxo	34%	ARA-C	22%	Ibr	11%	NGQD	11%	Chl	11%	Mel	11%	<p>Modello farmaco</p> <p>■ Implicito ■ Esplicito ■ N/D</p>  <table border="1"> <thead> <tr> <th>Modello farmaco</th> <th>Percentuale</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Implicito</td> <td>40%</td> </tr> <tr> <td>Esplicito</td> <td>20%</td> </tr> <tr> <td>N/D</td> <td>40%</td> </tr> </tbody> </table>	Modello farmaco	Percentuale	Implicito	40%	Esplicito	20%	N/D	40%
Farmaco utilizzato	Percentuale																						
Doxo	34%																						
ARA-C	22%																						
Ibr	11%																						
NGQD	11%																						
Chl	11%																						
Mel	11%																						
Modello farmaco	Percentuale																						
Implicito	40%																						
Esplicito	20%																						
N/D	40%																						
<p><i>Figura 8. Grafico a torta che mostra i farmaci utilizzati negli articoli.</i></p>	<p><i>Figura 9. Grafico a torta che mostra la tipologia di modello del farmaco trovato negli articoli.</i></p>																						

Da tale analisi descrittiva si è arrivati alla scelta in particolare di due articoli [9], [10] che introducono modelli adatti alla descrizione della proliferazione di cellule tumorali in sospensione (tumori liquidi) e allo stesso tempo utilizzano, per descrivere il modello matematico, equazioni della stessa tipologia di quella ricavata precedentemente.

In entrambi i suoi articoli Guzev, come primo passo per la previsione matematica dell'efficacia dei farmaci in vivo a partire da studi di citotossicità in vitro, utilizza le cellule leucemiche murine A20 con un tempo di coltura pari a 72 ore.

Innanzitutto, egli afferma che la crescita logistica descrive al meglio la proliferazione delle cellule in vitro e testa in vitro l'efficacia citotossica di determinati farmaci antitumorali approvati dalla *Food and Drug Administration (FDA)*: in entrambi i lavori identificati viene usata Citarabina (Cyt) come farmaco e in uno dei due lavori se ne confronta l'effetto con

quello dell'Ibrutinib (Ibr) [9], mentre nell'altro lavoro se ne confronta l'efficacia con quella di Clorambucile (Chl) e con il Melfalan (Mel) [10].

In entrambi i casi la Citarabina è risultata il più citotossico dei farmaci per la sua capacità di essere incorporata dal DNA, portando all'interruzione della replicazione delle cellule.

Dall'analisi comparativa sui vari articoli scelti, si deduce che il modello esponenziale non è adatto allo studio dell'azione del farmaco nel medio lungo termine, proprio perché ipotizza una crescita infinita del tumore, biologicamente irrealistica soprattutto se si vuole studiare l'effetto del farmaco per un tempo maggiore delle 24 ore. Il modello di Gompertz è applicabile prettamente su tumori solidi che non sono però oggetto del caso sperimentale studiato [14], [15].

Si è giunti, quindi, alla conclusione che il modello logistico è quello che più si addice allo specifico caso, in cui si analizza la risposta di cellule tumorali in vitro, in sospensione.

In particolare, si partirà dall'equazione di conservazione della massa che tiene conto dell'azione del farmaco e della sua diffusione [16]:

$$\frac{\partial[\cdot]}{\partial t} + \nabla \cdot (\vec{u}[\cdot]) - \delta_D \nabla^2[\cdot] = f(\cdot) - g(\cdot) - K_{[\cdot]} z(M)[\cdot]$$

Al primo membro il termine $\frac{\partial[\cdot]}{\partial t}$ studia la dinamica sia in funzione del tempo che dello spazio tramite una derivata temporale parziale; il gradiente del vettore velocità $\nabla \cdot (\vec{u}[\cdot])$ rappresenta il termine di avvezione; la diffusione $\delta_D \nabla^2[\cdot]$ è espressa tramite un coefficiente che moltiplica un gradiente al quadrato.

Al secondo membro, invece, i termini $f(\cdot) - g(\cdot)$ tengono conto del tasso di proliferazione, della competizione tra le cellule e dell'inibizione dipendente dal ruolo di ogni cellula; infine, l'effetto del farmaco è rappresentato da un *kill term* $K_{[\cdot]} z(M)[\cdot]$, in cui

- il termine $z(M) = 1 - e^{-M}$ indica che i farmaci chemioterapici sono efficienti solamente durante alcune fasi del ciclo cellulare e cinetica del farmaco;
- il parametro $K_{[\cdot]}$ si basa sulla capacità di interrompere il processo di divisione e di crescita.

In questa equazione, quindi si analizza la concentrazione delle cellule sia nello spazio che nel tempo. Considerando solo le dinamiche temporali, è possibile arrivare ad una formula ridotta della conservazione della massa che costituirà l'equazione di partenza del modello matematico da studiare:

$$\frac{d[\cdot]}{dt} = f(\cdot) - g(\cdot) - K_{[\cdot]} z(M)[\cdot]$$

in cui il termine di proliferazione seguirà la crescita logistica, mentre il termine rappresentante l'effetto del farmaco (farmacocinetica) sarà descritto, in modo esplicito o implicito, da un'unica equazione relativa alla sua concentrazione [16].

3.4. Confronto tra i risultati della letteratura e quelli ottenuti in Python

Guzev, come primo passo per la previsione matematica dell'efficacia dei farmaci in vivo a partire da studi di citotossicità in vitro, utilizza le cellule leucemiche murine A20.

I risultati della simulazione dimostrano che in entrambi i casi il modello prevede correttamente gli effetti dei farmaci sulle cellule leucemiche; esso, quindi, può essere utilizzato, secondo Guzev, come strumento generale per studiare l'attività dei vari farmaci con dosi e modalità d'azioni diverse, regolando opportunamente i valori dei parametri selezionati.

Modelli matematici come quelli descritti da Guzev dovrebbero, quindi, offrire l'opportunità di prevedere una terapia farmacologica personalizzata per singoli pazienti e stabilire protocolli di trattamento più efficienti [9], [10].

Innanzitutto, Guzev osserva la crescita cellulare senza l'effetto del farmaco nel lungo termine.

Per determinare i tassi di crescita e morte cellulare, le cellule A20 sono state campionate ogni 12 ore, a partire dalla 48esima ora, per la conta delle cellule totali e vitali con diverse concentrazioni iniziali per 312 ore:

- $5 \cdot 10^4 \frac{\text{cellule}}{\text{mL}}$ linea blu tratteggiata,
- $1 \cdot 10^4 \frac{\text{cellule}}{\text{mL}}$ linea rossa tratteggiata,
- $5 \cdot 10^3 \frac{\text{cellule}}{\text{mL}}$ linea verde tratteggiata.

I risultati ad ogni punto temporale sono la media di tre esperimenti ripetuti.

La naturale diminuzione della vitalità cellulare dopo il picco massimo è dovuta alle condizioni di crescita non ottimali derivanti dalla privazione di nutrienti, dalla diminuzione del pH e dal sovraffollamento cellulare, che induce la morte per necrosi e apoptosi.

Successivamente l'autrice confronta tali curve di crescita e morte naturale sperimentali in vitro con simulazioni numeriche espresse da linea continua, sempre a diverse concentrazioni cellulari di partenza.

I dati hanno mostrato una forte correlazione tra la simulazione e i risultati sperimentali sia per il tempo che per la concentrazione cellulare sia al punto massimo che a quello finale. La correlazione si è mantenuta per tutte e tre le concentrazioni iniziali.

Per studiare il fitting tra le curve di simulazione e quelle sperimentali Guzev calcola il valore quadrato dei residui (RMSE) mediante la seguente formula [10]:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_i^n (Sim_i - Exp_i)^2}{n}}$$

dove *Sim* è il dato numerico della simulazione (valore previsto), *Exp* è il dato sperimentale (valore osservato) e *n* è il numero di osservazioni.

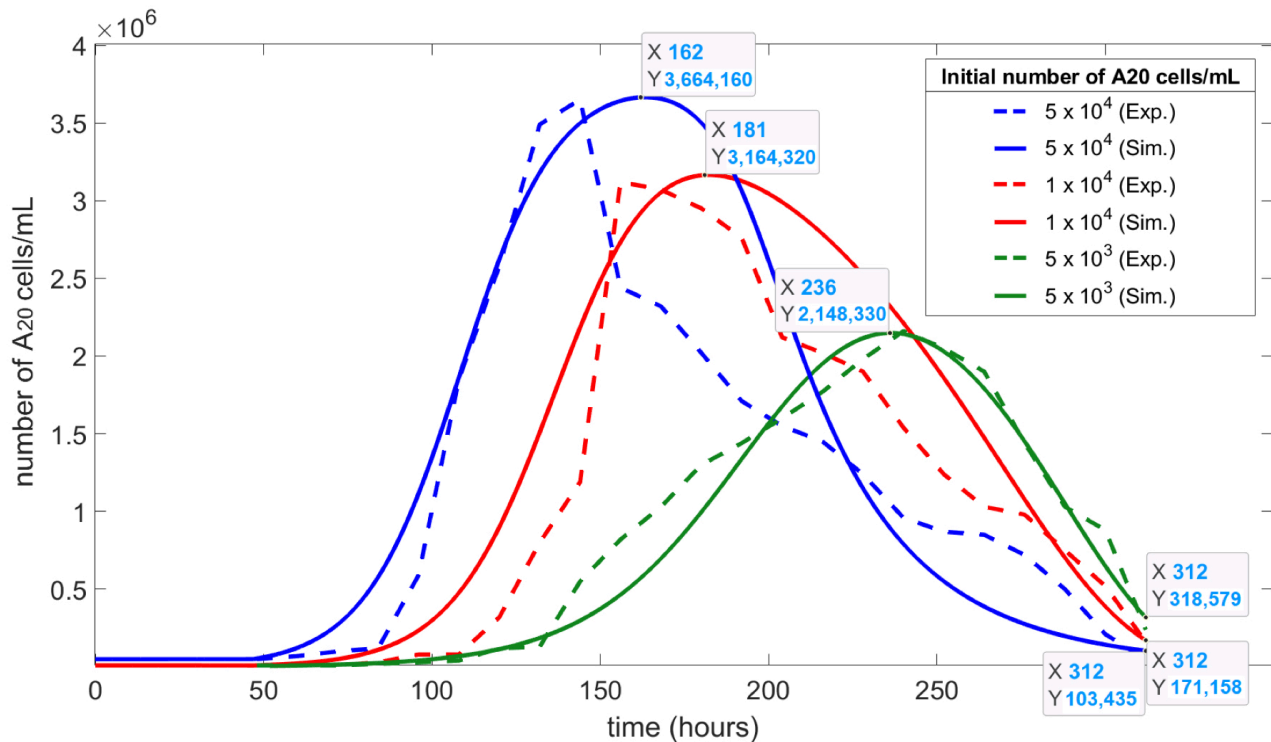


Figura 10. Grafico dell'articolo di Guzev: evoluzione temporale di cellule A20 vive (linee solide) e dei dati sperimentali reali di cellule A20 in vitro (linee tratteggiate) a diverse concentrazioni cellulari iniziali.

Dal codice implementato su Python con i dati presenti in letteratura, senza tener conto inizialmente dell'effetto del farmaco nel lungo termine, quindi oltre le 300 ore, sono stati ottenuti risultati molto simili a quelli dell'autrice: osservando i grafici con linee continue la salita della curva appare uguale, mentre l'ampiezza leggermente inferiore e la discesa più ripida.

In generale, potrebbe esserci un effetto legato al solutore numerico.

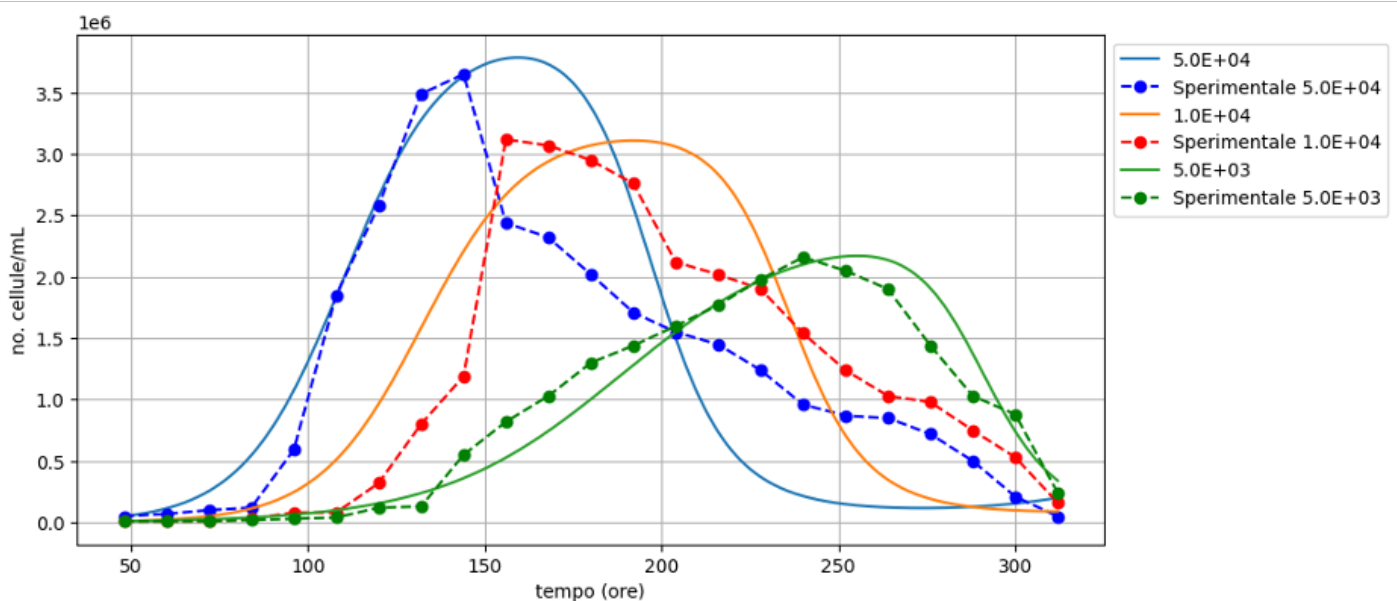


Figura 11. Grafico che mostra la validazione del modello senza farmaco.

Dal grafico ottenuto calcolando l'errore qualitativo per ogni concentrazione iniziale, si evince che per tempi abbastanza brevi si ha un errore accettabile, fino alla 200^a ora; oltre le 200 ore esso aumenta nettamente per poi riasestarsi verso le 300 ore. Questo probabilmente si verifica perché il trend simulato scende più velocemente rispetto a quello sperimentale e da letteratura.

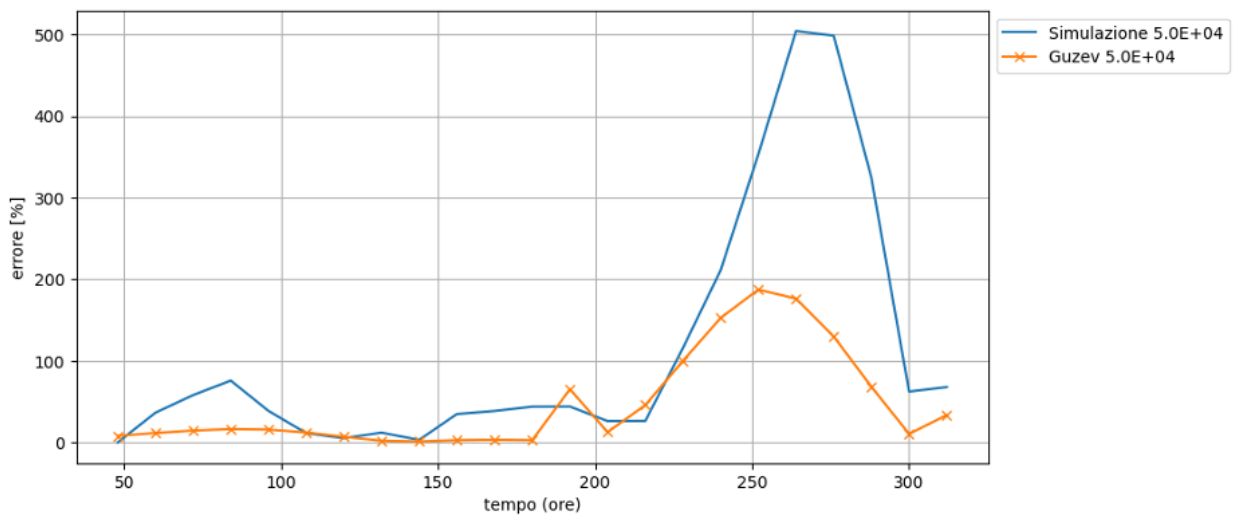


Figura 12. Grafico che mostra l'errore tra i risultati ottenuti e quelli dell'articolo di Guzev senza considerare l'effetto del farmaco con una concentrazione di cellule iniziali pari a $5 \cdot 10^4 \frac{\text{cellule}}{\text{mL}}$.

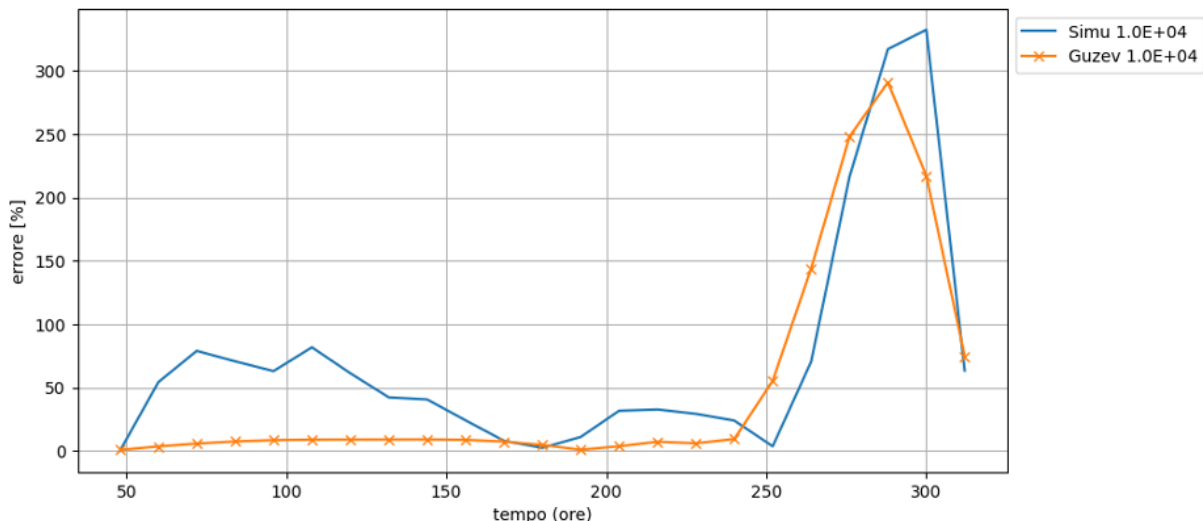


Figura 13. Grafico che mostra l'errore tra i risultati ottenuti e quelli dell'articolo di Guzev senza considerare l'effetto del farmaco con una concentrazione di cellule iniziali pari a $1 \cdot 10^4 \frac{\text{cellule}}{\text{mL}}$.

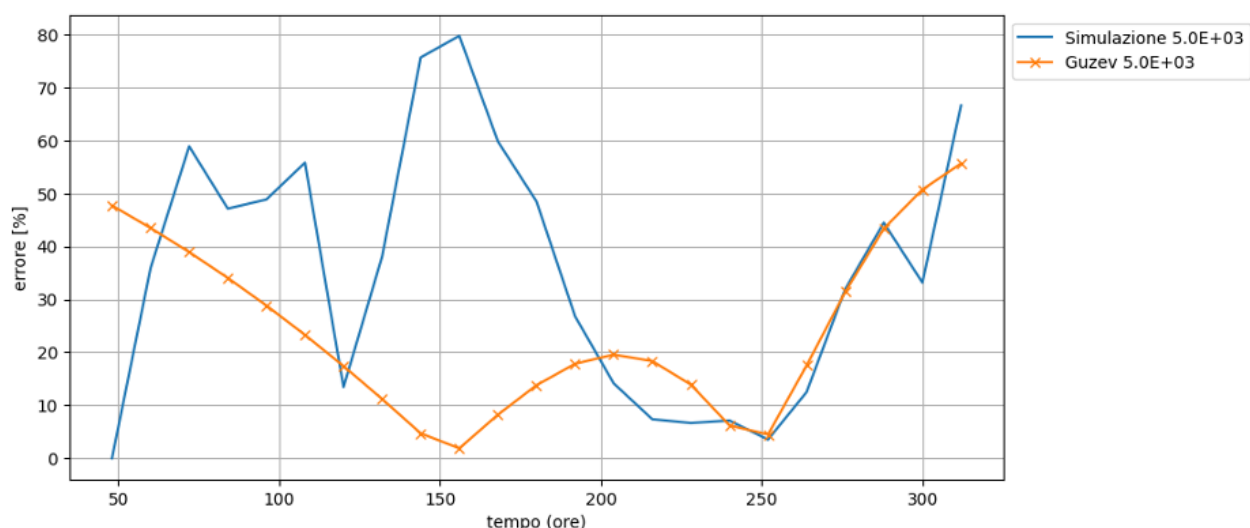


Figura 14. Grafico che mostra l'errore tra i risultati ottenuti e quelli dell'articolo di Guzev senza considerare l'effetto del farmaco con una concentrazione di cellule iniziali pari a $5 \cdot 10^3 \frac{\text{cellule}}{\text{mL}}$.

Successivamente l'autrice simula numericamente l'effetto della Citarabina sulle cellule A20 con concentrazione iniziale $2 \cdot 10^4 \frac{\text{cellule}}{\text{mL}}$: le curve tratteggiate rappresentano le diverse concentrazioni del farmaco; la curva rossa continua indica il controllo senza farmaco.

Dopo 72 ore, la concentrazione di crescita delle cellule A20 senza farmaco è aumentata esponenzialmente, mentre l'aggiunta di esso ne ha permesso man mano una riduzione.

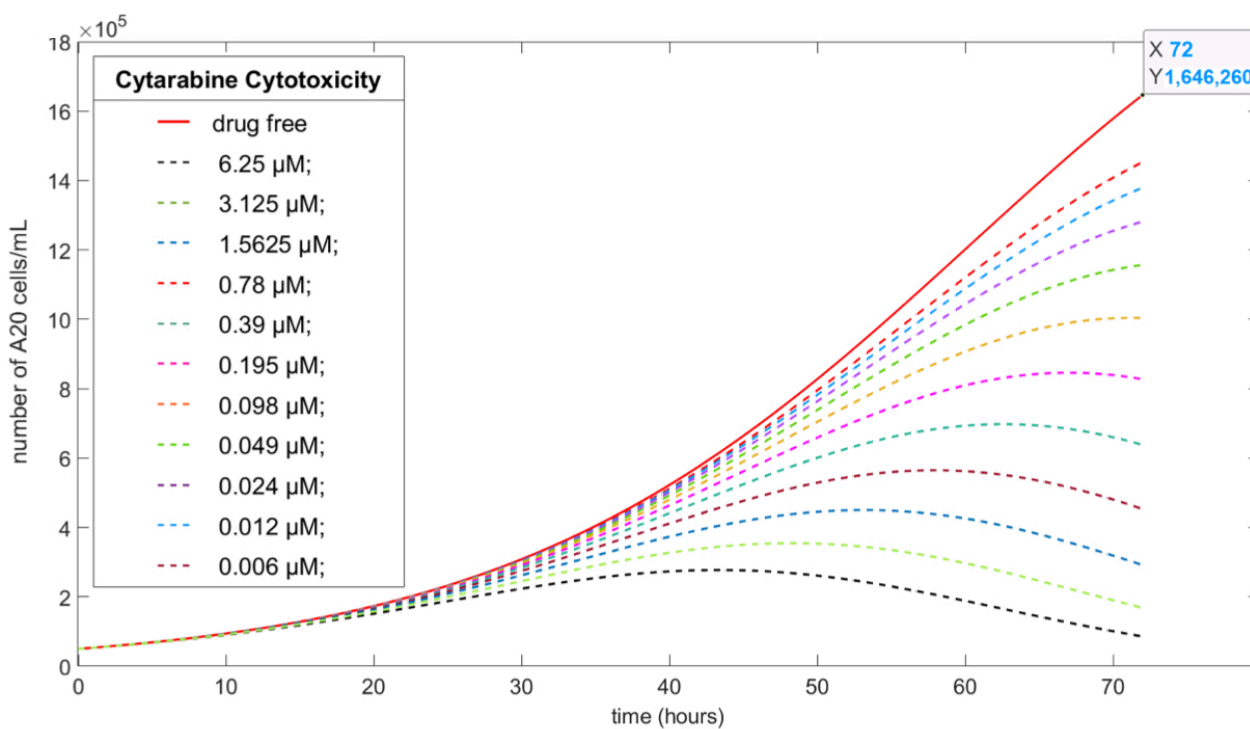


Figura 15. Grafico dell'articolo di Guzev che mostra l'effetto del farmaco Citarabina in 72 ore.

Effettuando un test, tenendo conto dell'effetto del farmaco nel breve termine (entro le 72 ore), si può notare un cambiamento delle curve precedenti com'è possibile vedere nel grafico seguente:

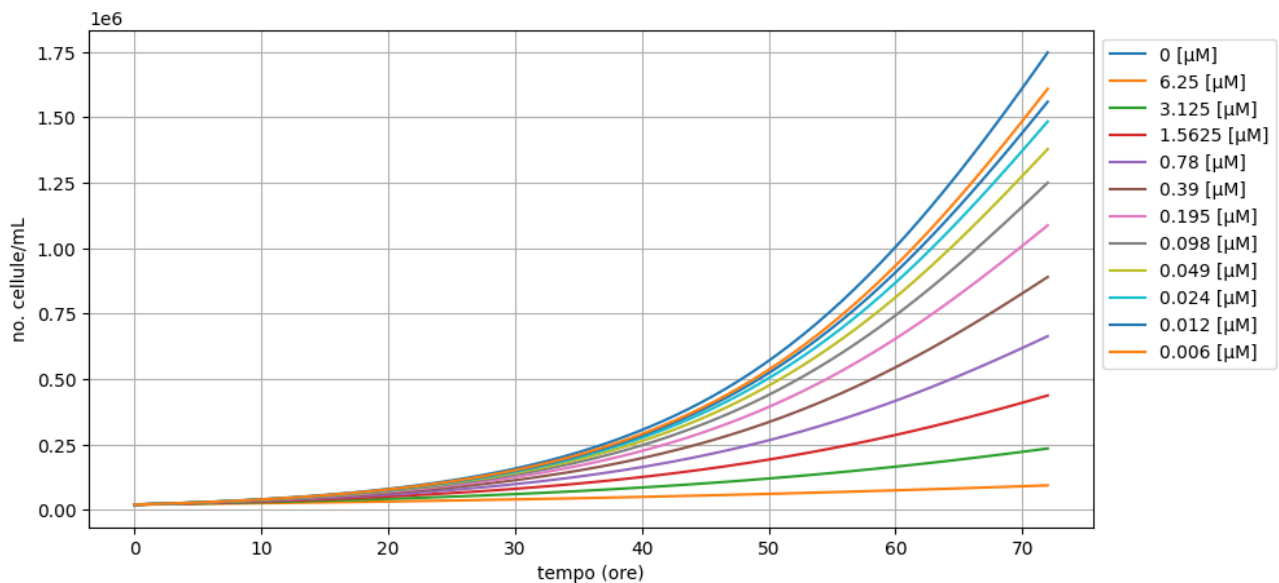


Figura 16. Grafico che mostra l'effetto del farmaco nel tempo in 72 ore.

Mettendo a confronto i due grafici, quest'ultimo non presenta una decrescita finale come se l'effetto del farmaco fosse meno intenso del previsto; ciò potrebbe essere legato alla dissoluzione delle cellule morte: essendo troppo veloce, potrebbe cogliersi meno l'effetto del farmaco.

Considerando, invece, l'andamento dell'errore delle cellule vive nel breve termine per ogni dose di farmaco utilizzata risulta che, rispetto alla letteratura, l'errore medio è pari al 25,2%.

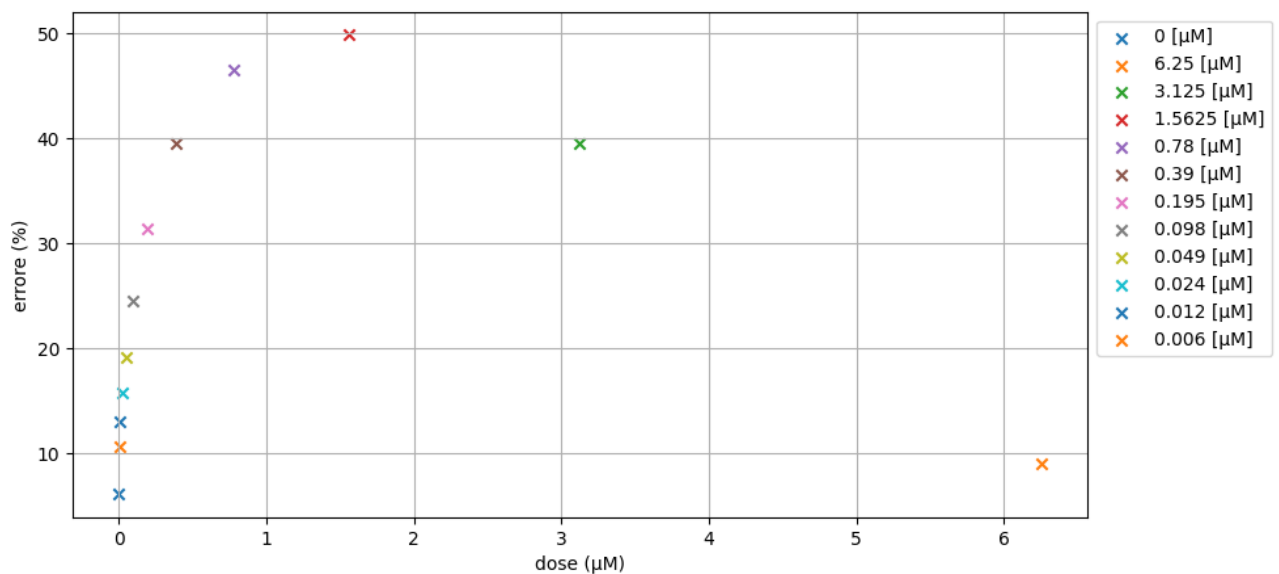


Figura 17. Grafico che mostra l'errore per ogni dose di farmaco.

Si può affermare che per valori molto bassi o molto alti di farmaco si ha un errore più contenuto rispetto, invece, a valori intermedi.

3.5. Analisi di sensitività

Innanzitutto, viene studiato quanto il modello sia sensibile rispetto alla modifica dei parametri iniziali, anche detti parametri sperimentali.

Aumentando il numero di cellule vive iniziali si ha un aumento della velocità con cui le cellule proliferano e, allo stesso tempo, una diminuzione del tempo disponibile prima del decadimento a causa della competizione per i nutrienti.

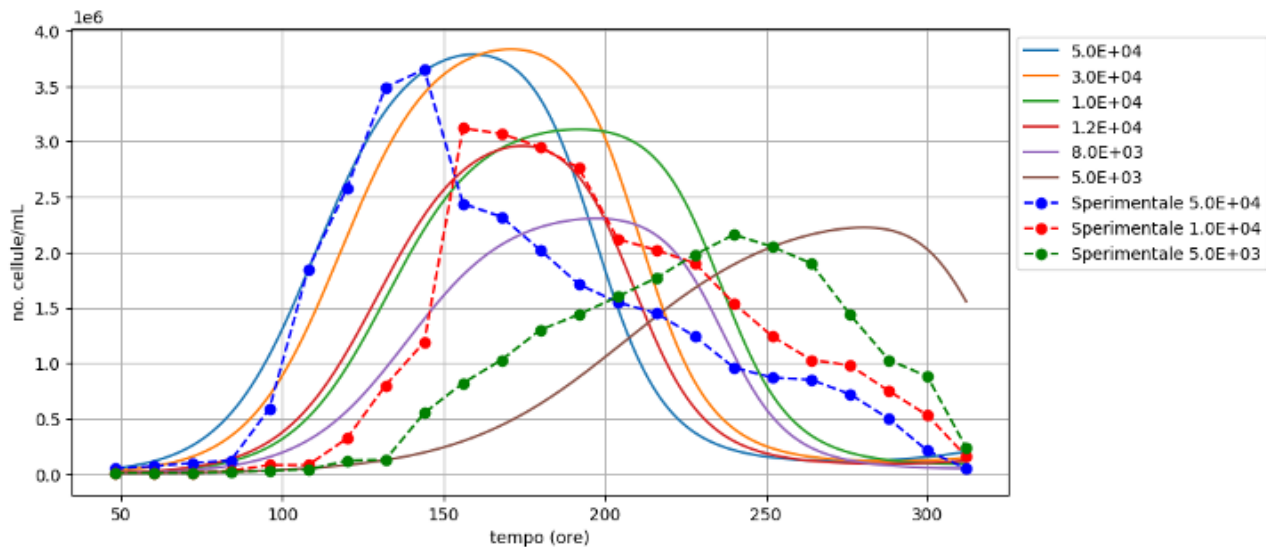


Figura 18. Grafico che mostra la sensitività delle cellule vive iniziali senza farmaco.

Modificando il numero di cellule morte iniziali, invece, si ha una restrizione della campana verso sinistra.

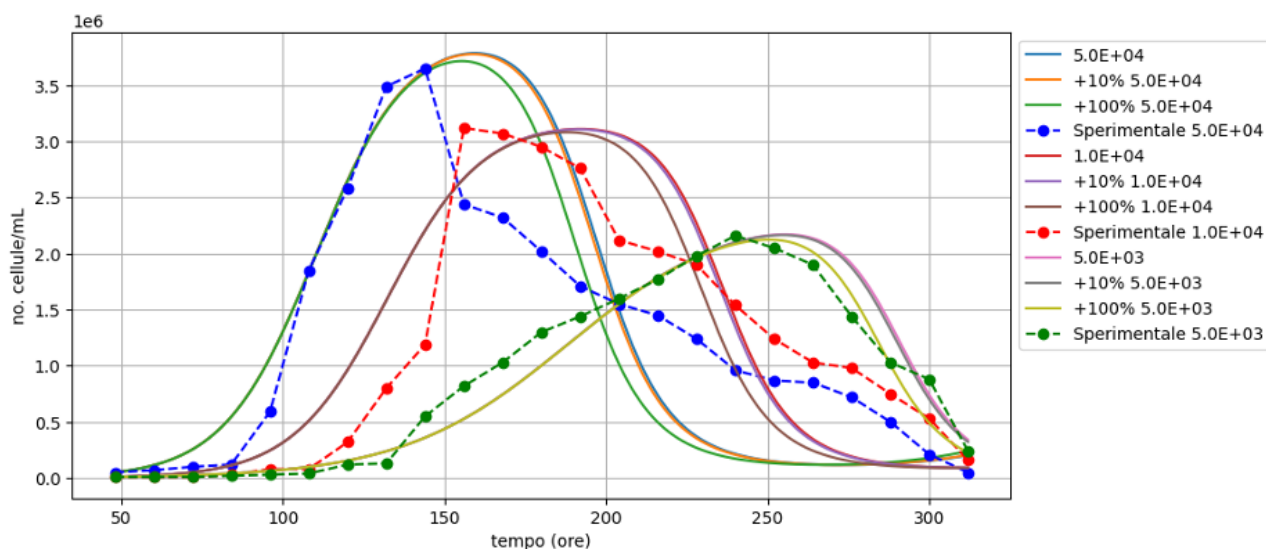


Figura 19. Grafico che mostra la sensitività delle cellule morte iniziali senza farmaco.

In conclusione, si può notare che si ha una partenza del grafico uguale, mentre cambia il numero massimo di cellule vitali nel pozzetto nella condizione di picco e per quanto tempo tale valore rimane invariato.

La campana, infatti, risulta ristretta e allo stesso tempo si riduce il numero massimo di cellule vitali presenti nel pozzetto.

Successivamente viene valutato quanto il modello sia sensibile alla modifica degli stessi suoi parametri.

Più precisamente, aumentando il tasso di crescita r si ha uno spostamento della curva a sinistra e verso l'alto: ciò significa che aumenta il numero massimo di cellule e viene raggiunto in un tempo inferiore. La coltura, quindi, arriva molto prima al limite di crescita man mano che si aumenta il tasso di crescita.

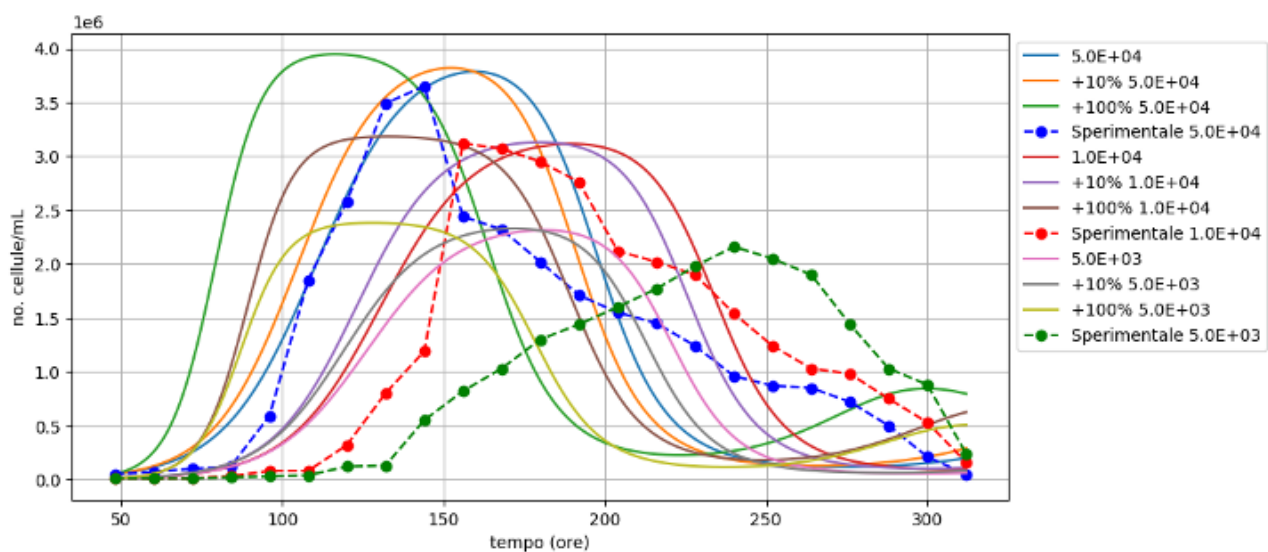


Figura 20. Grafico che mostra la sensibilità del tasso di crescita ' r ' senza farmaco.

Aumentando il limite di crescita K , ovvero il numero massimo di cellule che possono contemporaneamente essere vive prima che la competizione per le risorse non le porti a morire, si ha un innalzamento del numero massimo di cellule e una riduzione dell'ampiezza della campana.

Osservando la pendenza del grafico si nota come il numero di cellule cresca e allo stesso tempo diminuisca più in fretta (pendenza maggiore): ciò significa che le cellule riescono ad essere vive in grande quantità, ma per meno tempo.

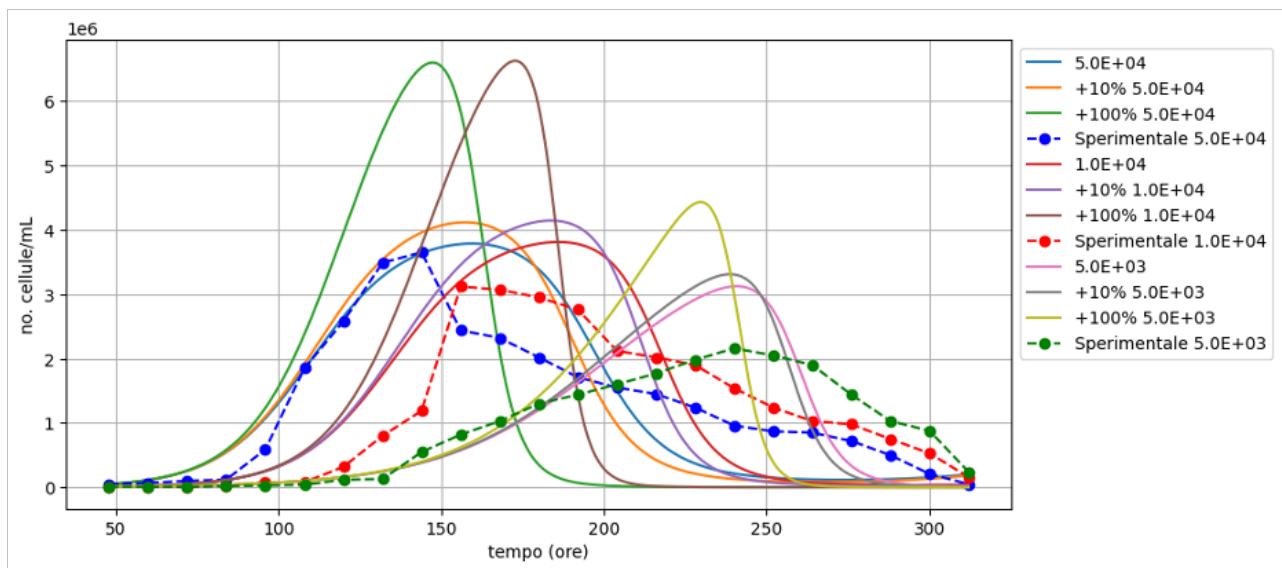


Figura 21. Grafico che mostra la sensitività del limite di crescita ' K ' senza farmaco.

Innalzando il tasso di morte μ_A si ha una riduzione repentina sia del tempo che del numero massimo di cellule che possono rimanere vitali.

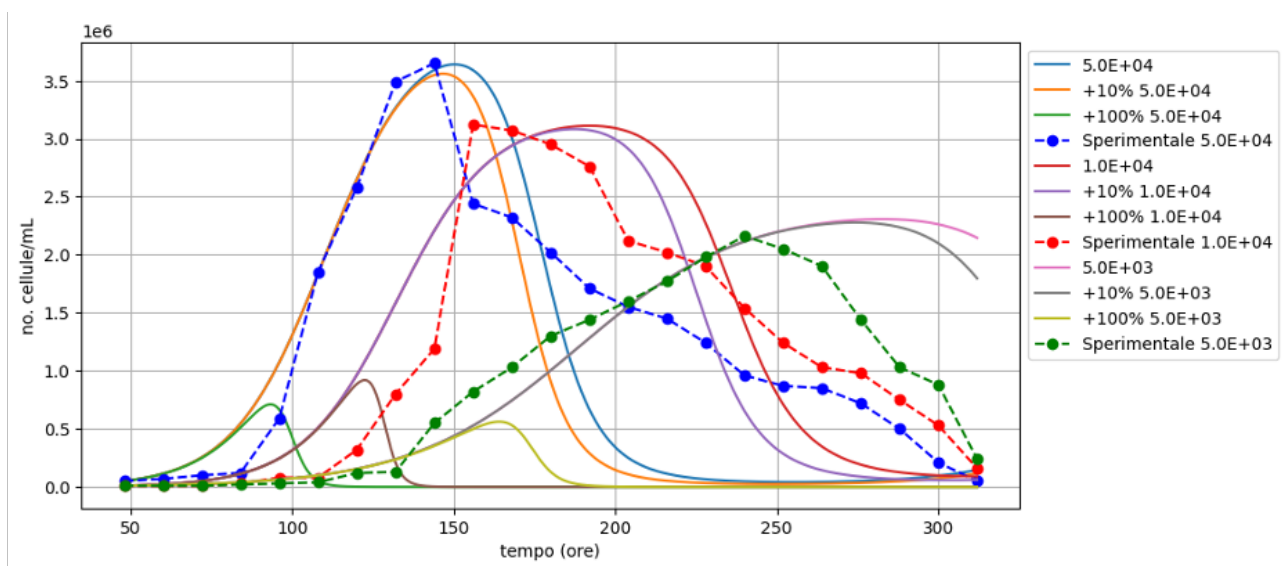


Figura 22. Grafico che mostra la sensitività del tasso di morte ' μ_A ' senza farmaco.

Infine, incrementando il tasso di smaltimento di cellule morte d , si ottiene un allargamento della campana (la coltura cellulare rimane viva per più tempo) e un piccolissimo aumento del numero massimo di cellule.

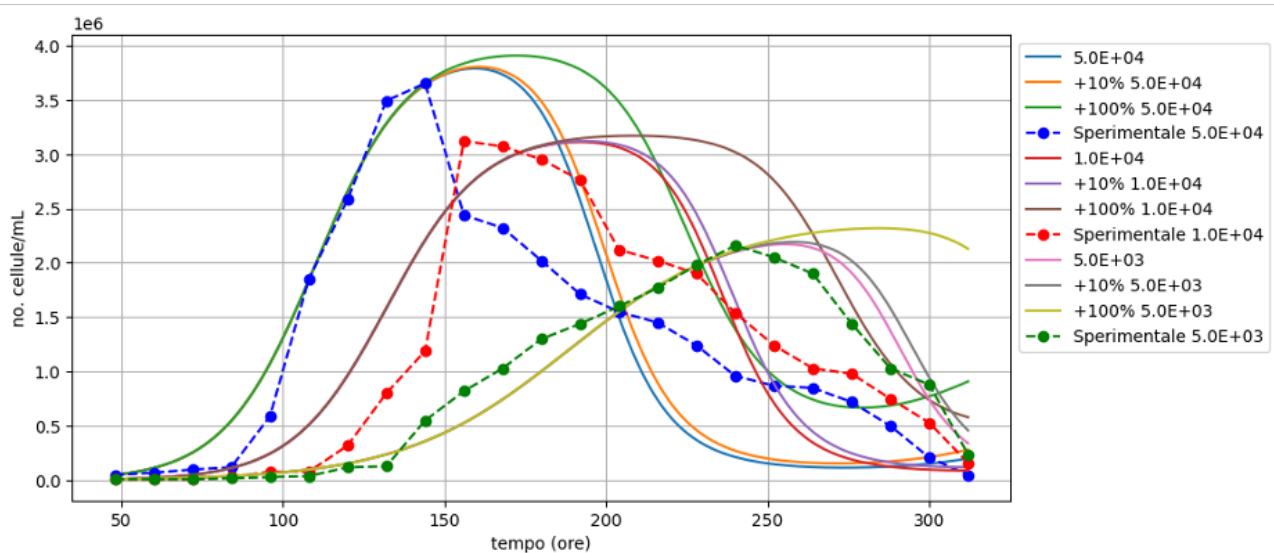


Figura 23. Grafico che mostra la sensibilità del tasso di smaltimento di cellule morte 'd' senza farmaco.

3.6. Confronto con i dati sperimentali disponibili

In seguito, per ottenere una previsione matematica dell'efficacia di ulteriori farmaci nel medio-lungo termine, si è passati ad utilizzare il modello di letteratura con i nuovi dati sperimentali inerenti, nello specifico, a due esperimenti (Esperimento 22, Esperimento 23), condotti presso l'Istituto Clinico Humanitas, Laboratorio di ricerche oncologiche, Dott. Carlo Stella, Rozzano, nell'ambito di una collaborazione con il Laboratorio di Organi Artificiali, Prof.ssa Costantino, LaBS, Dipartimento di Chimica, Materiali ed Ingegneria Chimica "Giulio Natta" del Politecnico di Milano.

Al momento della semina in ciascun pozzetto di volume 1.5 mL sono contenute 150.000 cellule vive (95,82%) e 6.544 cellule morte (4,18%).

Di conseguenza le condizioni iniziali al tempo $t = 0$ saranno

- $A(0) = 100.000 \left(\frac{\text{cellule}}{\text{mL}} \right)$: concentrazione iniziale di cellule vive;
- $A_d(0) = 4.362 \left(\frac{\text{cellule}}{\text{mL}} \right)$: concentrazione iniziale di cellule morte;
- $C(0) = \text{dose } (\mu\text{M}) \cdot 6 \cdot 10^{14}$: concentrazione iniziale di farmaco.

Come descritto nel paragrafo 2.6, dal calcolo del parametro μ_c della Gemcitabina si è ottenuto

$$\mu_c = 0,4423 \text{ ore}^{-1}$$

Dall'analisi di sensibilità per i parametri non trovati, senza considerare l'effetto del farmaco, si è notato che la variazione del tasso di smaltimento di cellule morte d è influente sull'andamento dei grafici sperimentali poiché agisce su una porzione avanzata (t elevato) per la quale non ci sono dati sperimentali sufficienti.

Considerando, invece, il tasso di crescita sperimentale r , in entrambi gli esperimenti si osserva che all'aumentare del limite di crescita K la "gobba", che compare inizialmente per minori densità cellulari, tende a scendere e ad allargarsi, senza, purtroppo, inseguire bene la parte finale del grafico sperimentale.

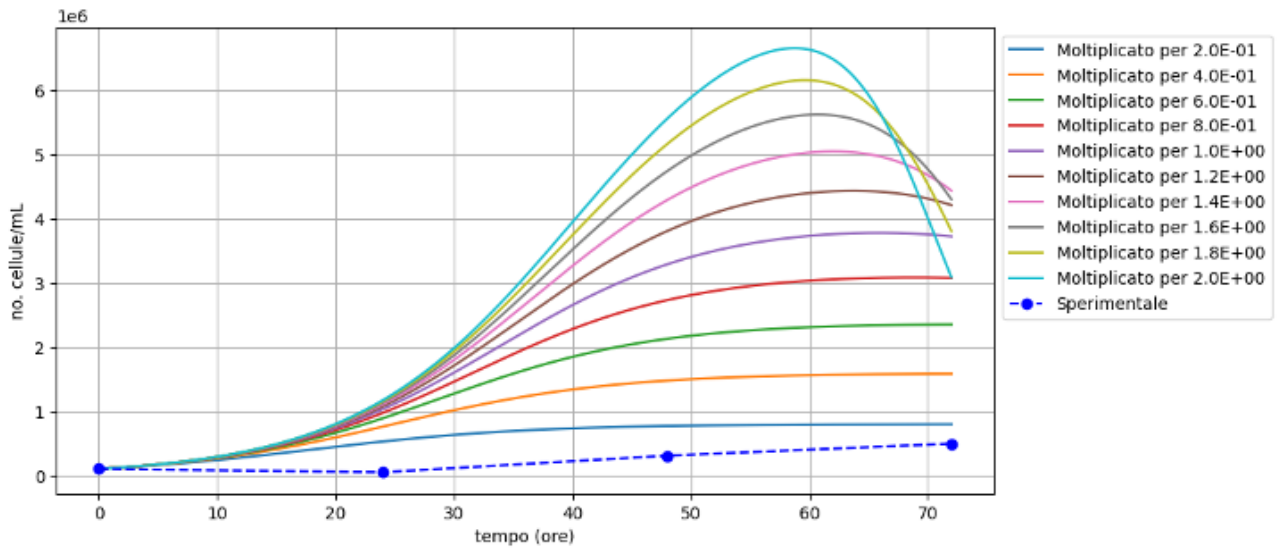


Figura 24. Grafico dell'esperimento 22 che mostra la sensitività del limite di crescita 'K' con tasso di crescita 'r' sperimentale.

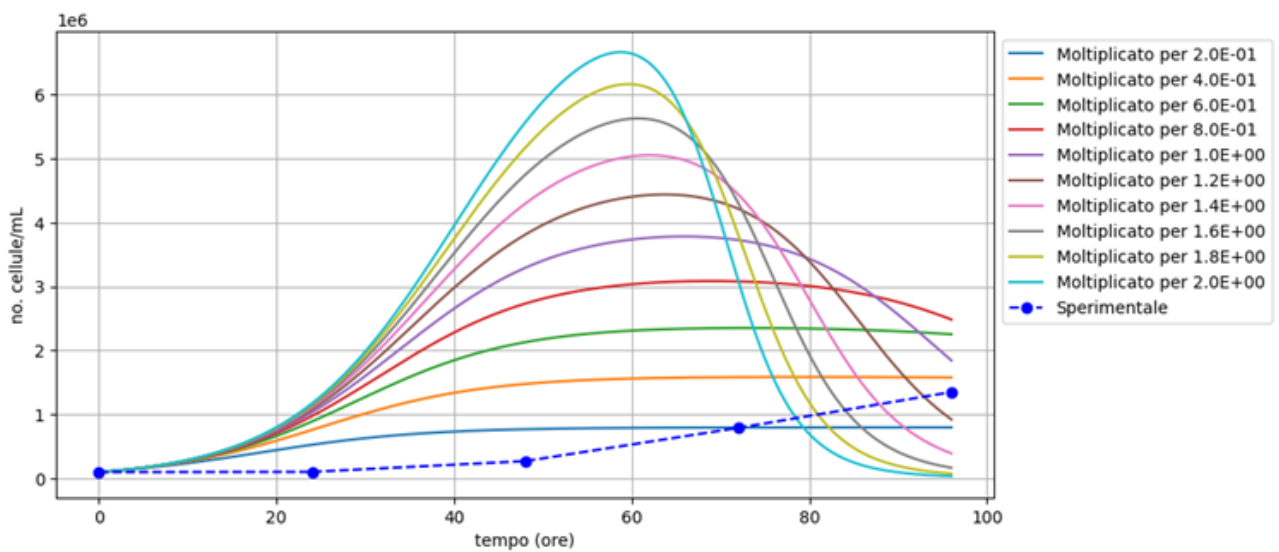


Figura 25. Grafico dell'esperimento 23 che mostra la sensitività del limite di crescita 'K' con tasso di crescita 'r' sperimentale.

Allo stesso tempo, variando, il tasso di morte μ_A si può notare come al suo aumentare il grafico si abbassi e si restringa, senza, anche in questo caso, riuscire a seguire l'andamento sperimentale.

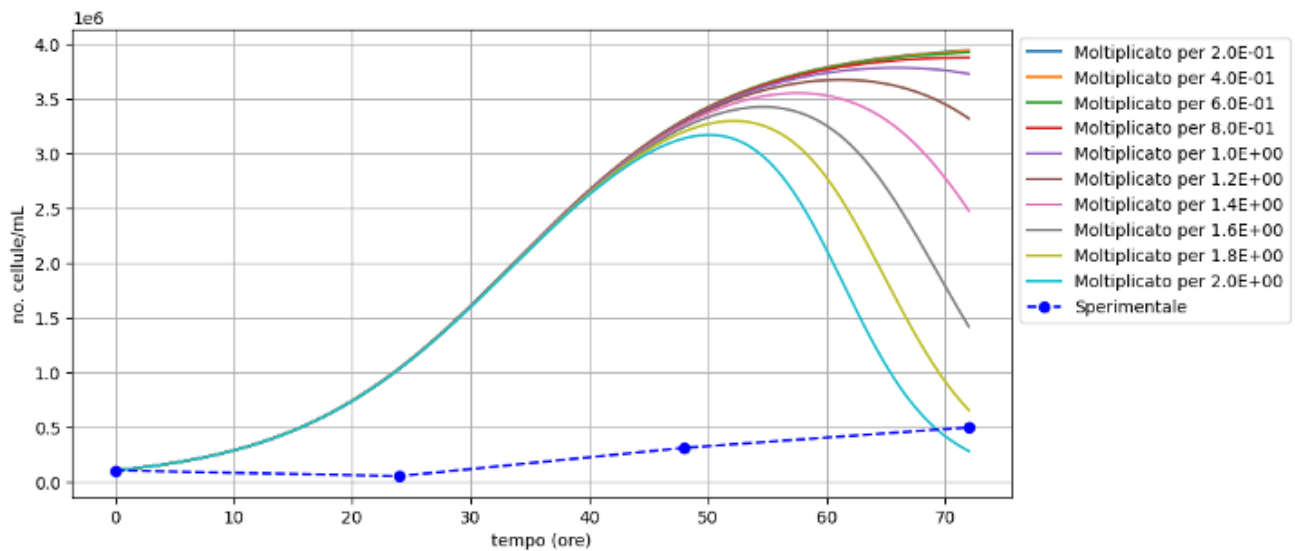


Figura 26. Grafico dell'esperimento 22 che mostra la sensitività del tasso di morte ' μ_A ' con tasso di crescita ' r ' sperimentale.

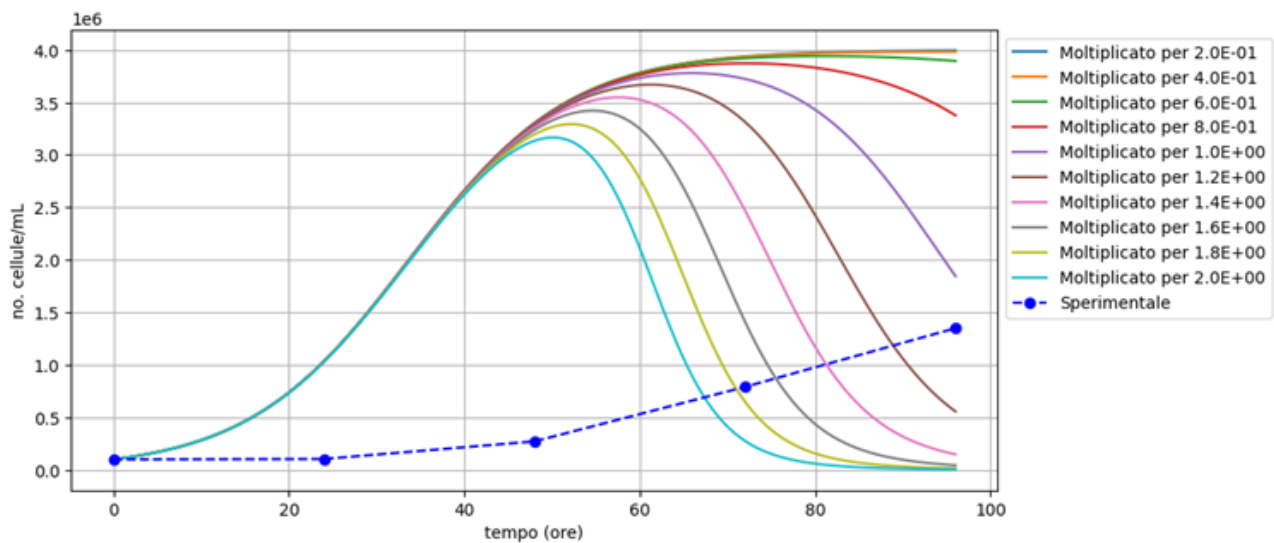


Figura 27. Grafico dell'esperimento 23 che mostra la sensitività del tasso di morte ' μ_A ' con tasso di crescita ' r ' sperimentale.

Si prova, così, a testare la combinazione della variazione dell'effetto dei parametri K e μ_A al fine di provare ad avvicinarsi il più possibile all'andamento sperimentale, considerando sempre lo stesso valore di r , ma, anche in questo caso, sebbene dei miglioramenti delle curve, non si riescono ad ottenere i risultati desiderati.

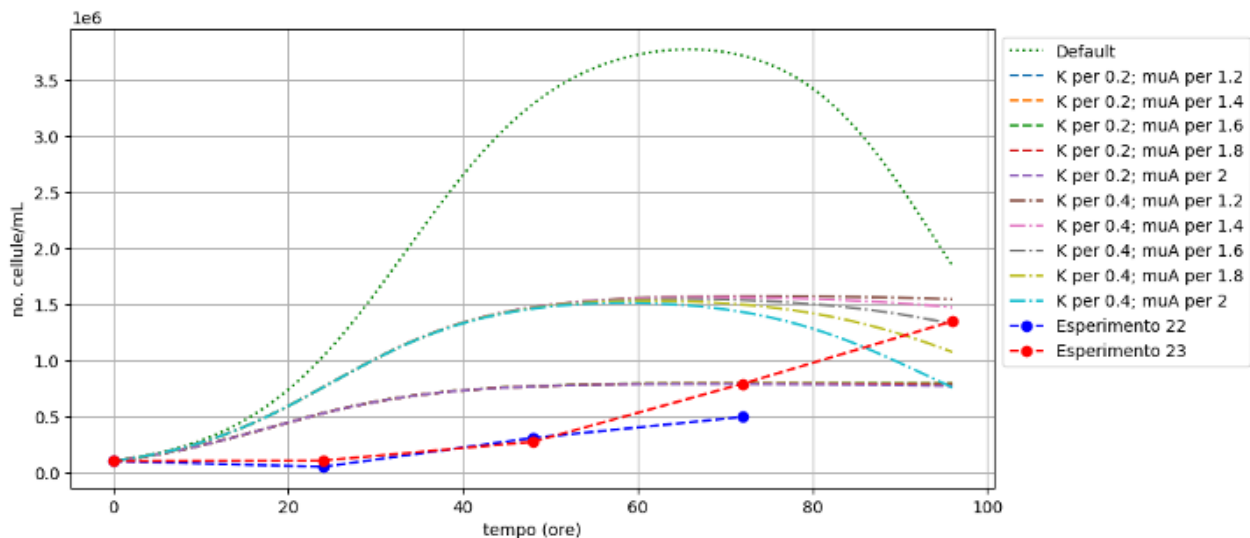


Figura 28. Grafico che mostra la combinazione degli effetti: limite di crescita 'K' con tasso di morte ' μA ' e tasso di crescita ' r ' sperimentale.

Rivalutando l'analisi di sensitività effettuata fino ad ora, si può intuire come l'unico parametro utile da variare per un efficiente funzionamento del modello, senza considerare ancora l'effetto del farmaco, sia il tasso di crescita r : si partirà da un range più ampio di valori fino ad arrivare ad un intorno sufficientemente preciso in modo che r sia parametrizzabile.

Da questo momento in poi verranno presi in considerazione solo i dati relativi all'esperimento 23 che viene considerato più attendibile allo studio del modello per la presenza nell'esperimento 22 di dati mancanti quali il numero di cellule vive a 96 ore.

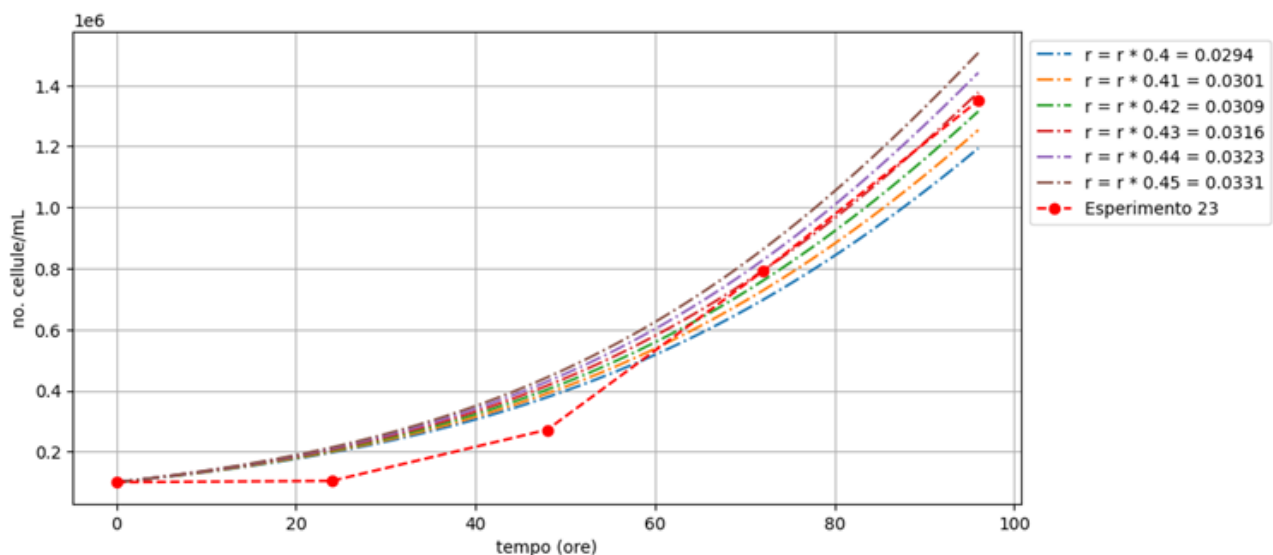


Figura 29. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di crescita ' r '.

Dal grafico ottenuto si può notare come un valore di r più basso insegue meglio la curva, di conseguenza un tasso di crescita più basso insegue meglio il risultato sperimentale.

Andando a calcolare la percentuale di errore su quest'ultimo parametro si evince che nel breve termine esso sia di gran lunga maggiore rispetto al lungo termine, dove, invece, diventa molto preciso.

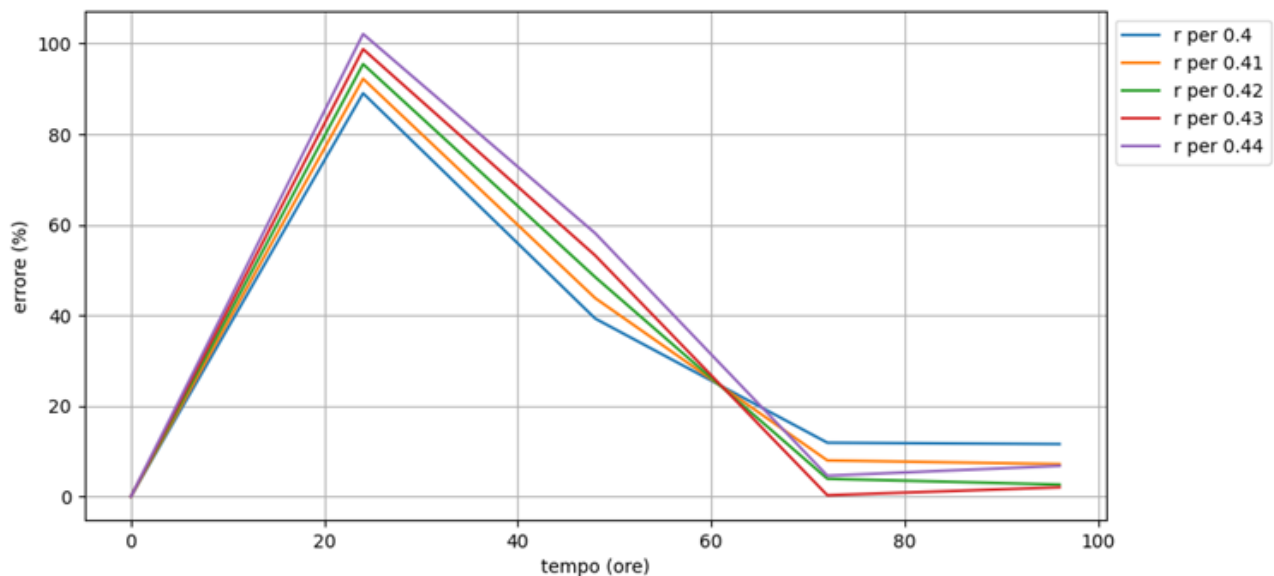


Figura 30. Grafico che mostra l'errore per ogni valore del tasso di crescita 'r'.

Considerando anche l'influenza della Gemcitabina sul modello, si decide di valutare l'effetto di modulazione del tasso di citotossicità μ_{AC} del farmaco, che agisce maggiormente sulla dose di quest'ultimo.

Ciò permetterà contemporaneamente la modifica del tasso di smaltimento del farmaco, dovuto all'uccisione delle cellule, dato che da letteratura sappiamo $\mu_{CA} = \mu_{AC} \cdot 10$.

Per le diverse dosi di Gemcitabina fornite, si ottengono i seguenti risultati:

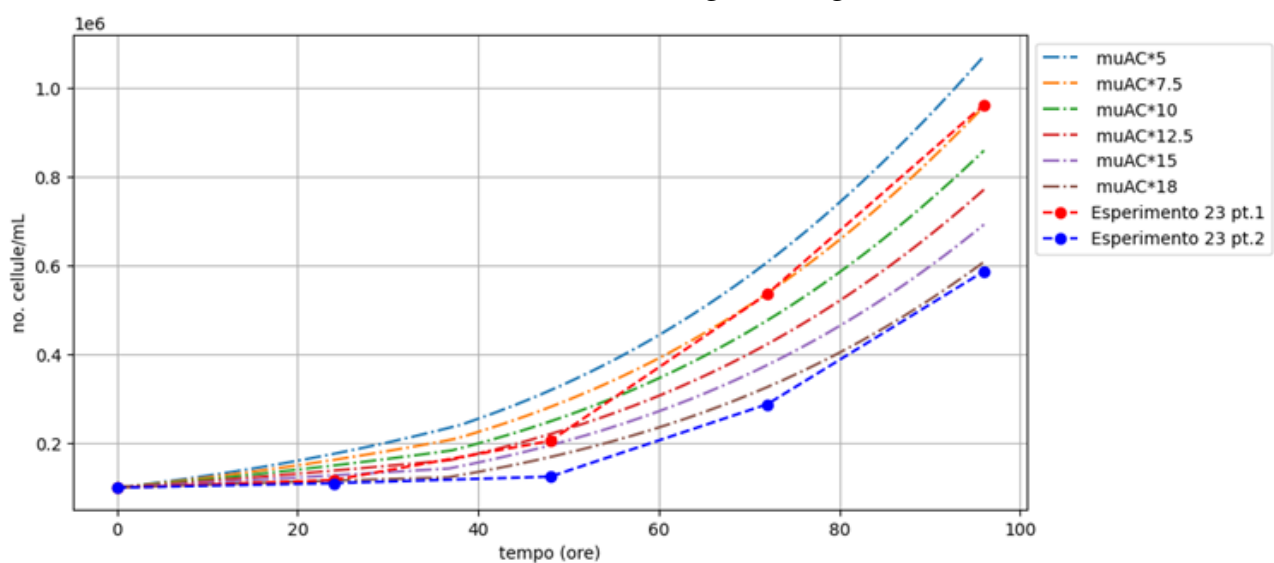


Figura 31. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,14 \cdot 10^{-3} [\mu M]$ dose di farmaco.

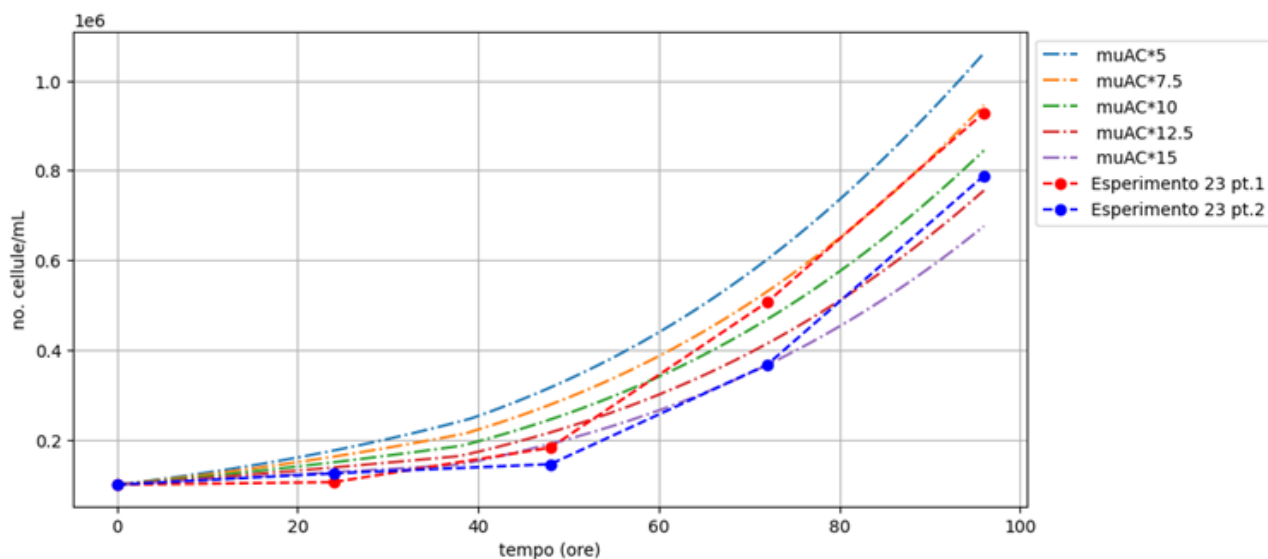


Figura 32. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,90 \cdot 10^{-3} [\mu M]$ dose di farmaco.

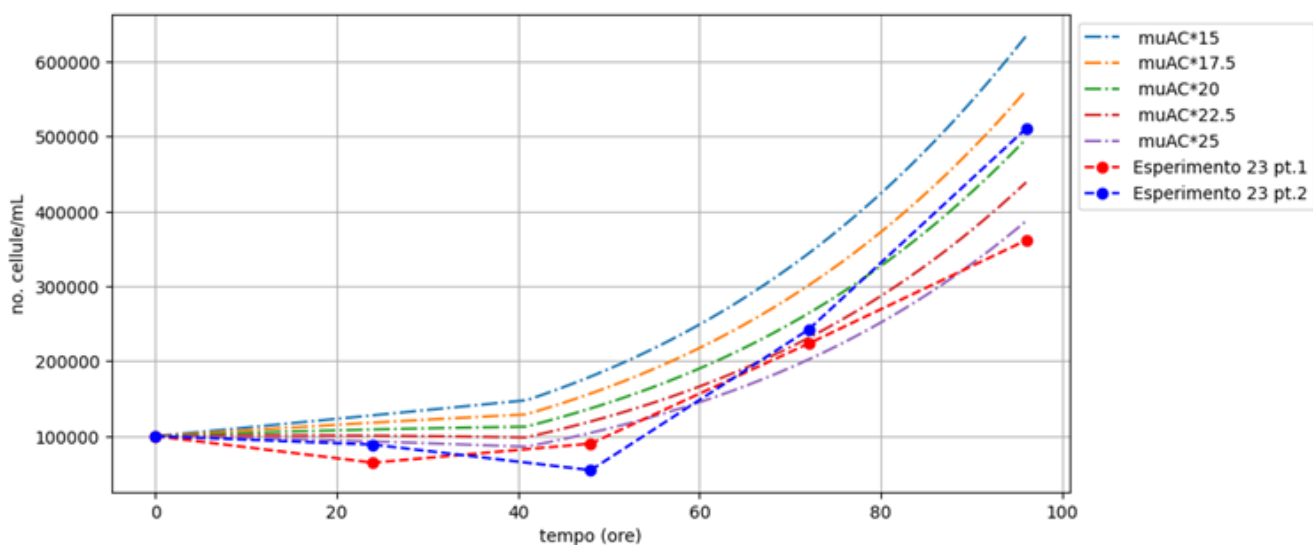


Figura 33. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $7,60 \cdot 10^{-3} [\mu M]$ dose di farmaco.

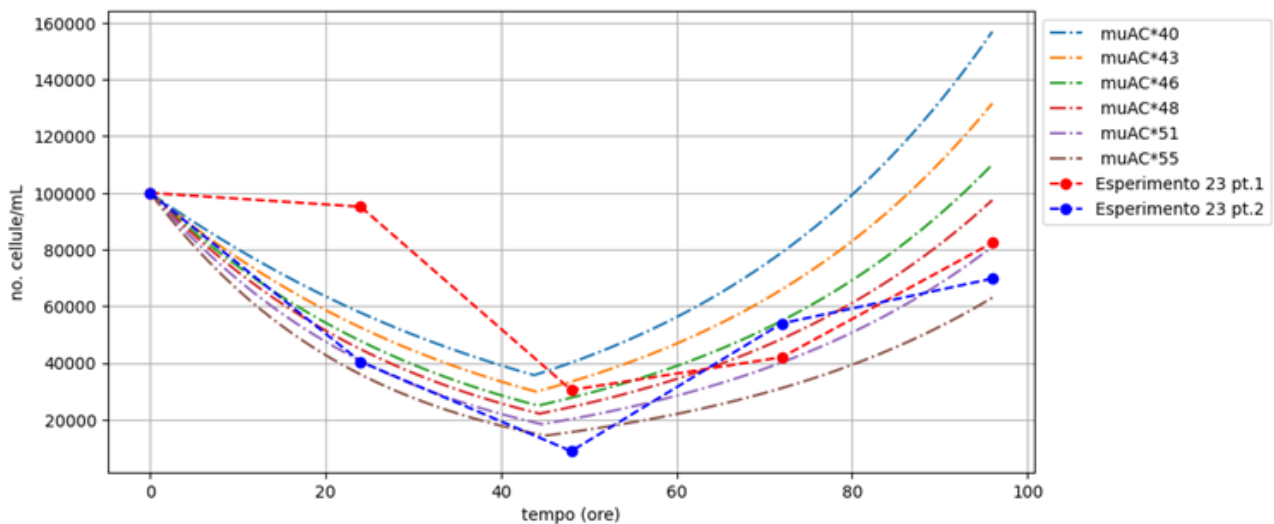


Figura 34. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,90 \cdot 10^{-2} [\mu M]$ dose di farmaco.

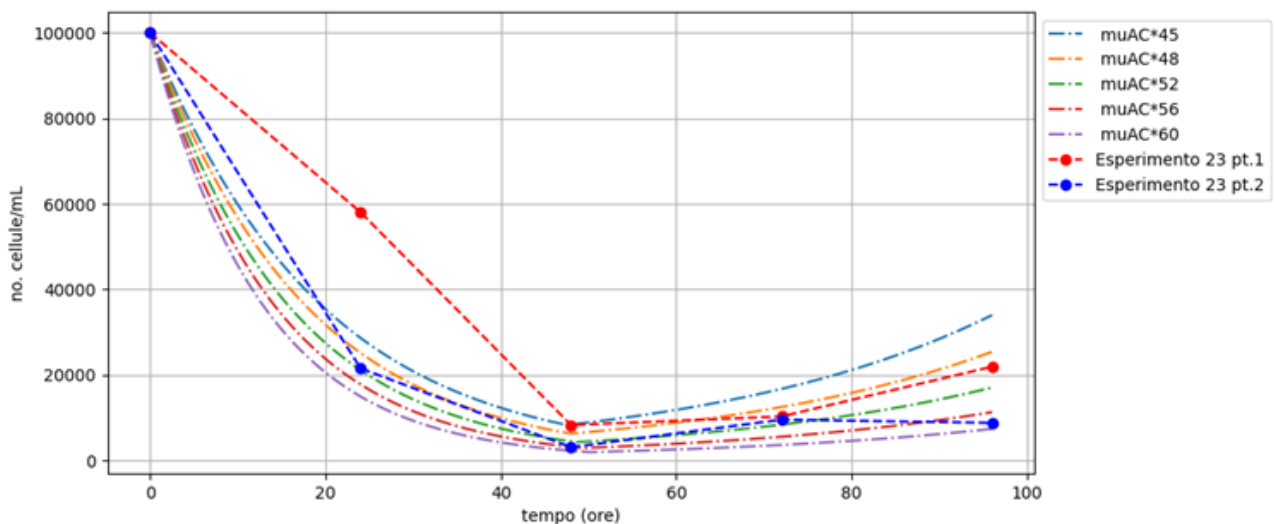


Figura 35. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $3,80 \cdot 10^{-2} [\mu M]$ dose di farmaco.

3.7. Calcolo dell'errore per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per ogni dose di farmaco

Calcolando l'errore qualitativo, come descritto nel paragrafo 2.7, i risultati delle diverse simulazioni mostrano che il modello riesce a prevedere quasi correttamente l'effetto del farmaco.

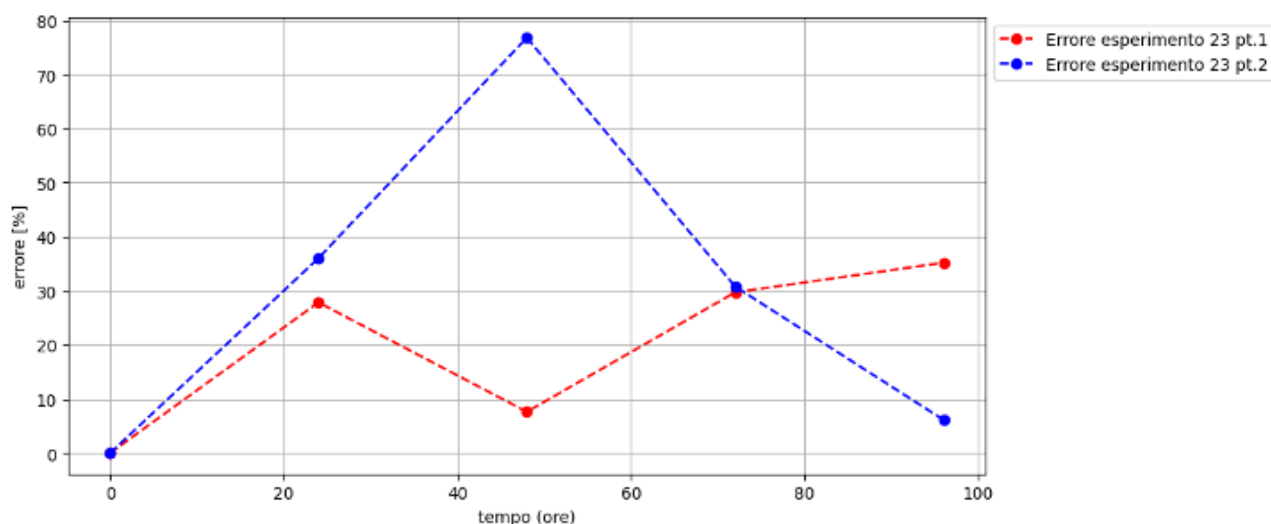


Figura 36. Grafico che mostra l'errore per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,14 \cdot 10^{-3} [\mu M]$ dose di farmaco.

Per la dose di farmaco pari a $1,14 \cdot 10^{-3} [\mu M]$ al tempo 48 ore l'errore massimo è pari al 76,8% e l'errore minimo 7,6%.

Con il miglior fitting per $\mu_{AC} = 0,0091 [ore^{-1}]$ è presente un errore medio del 20,1% per il primo set di dati e uno del 29,9% per il secondo.

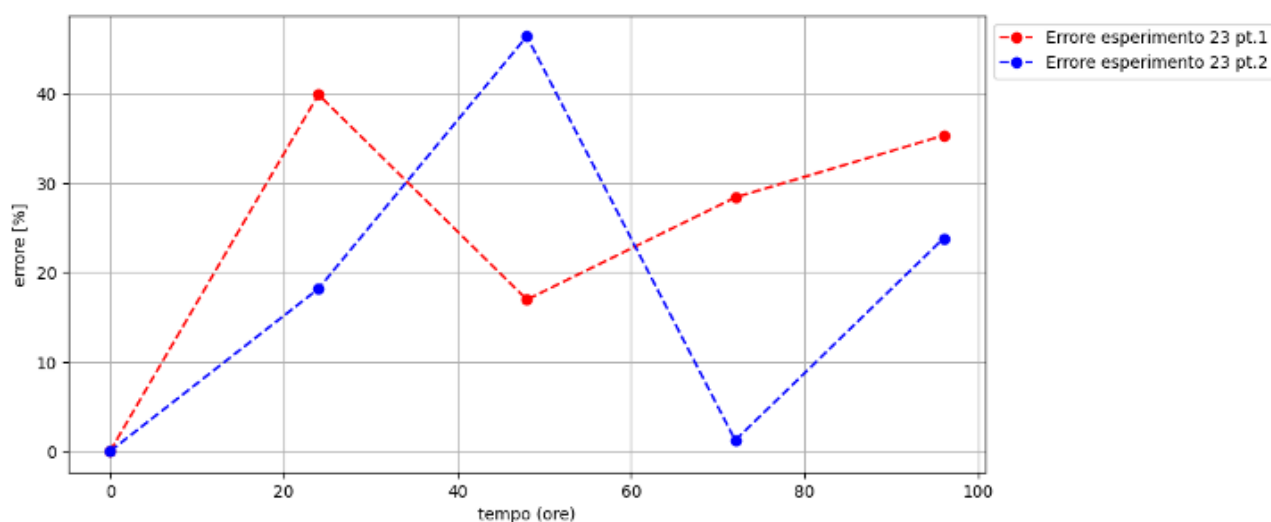


Figura 37. Grafico che mostra l'errore per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,90 \cdot 10^{-3} [\mu M]$ dose di farmaco.

Per la dose di farmaco $1,90 \cdot 10^{-3} [\mu M]$ al tempo 48 ore l'errore massimo è del 46,4% e l'errore minimo dell'1,2% al tempo 72 ore.

Con il miglior fitting per $\mu_{AC} = 0,00975 [ore^{-1}]$ è presente un errore medio del 24,1% per il primo set di dati e uno del 17,9% per il secondo.

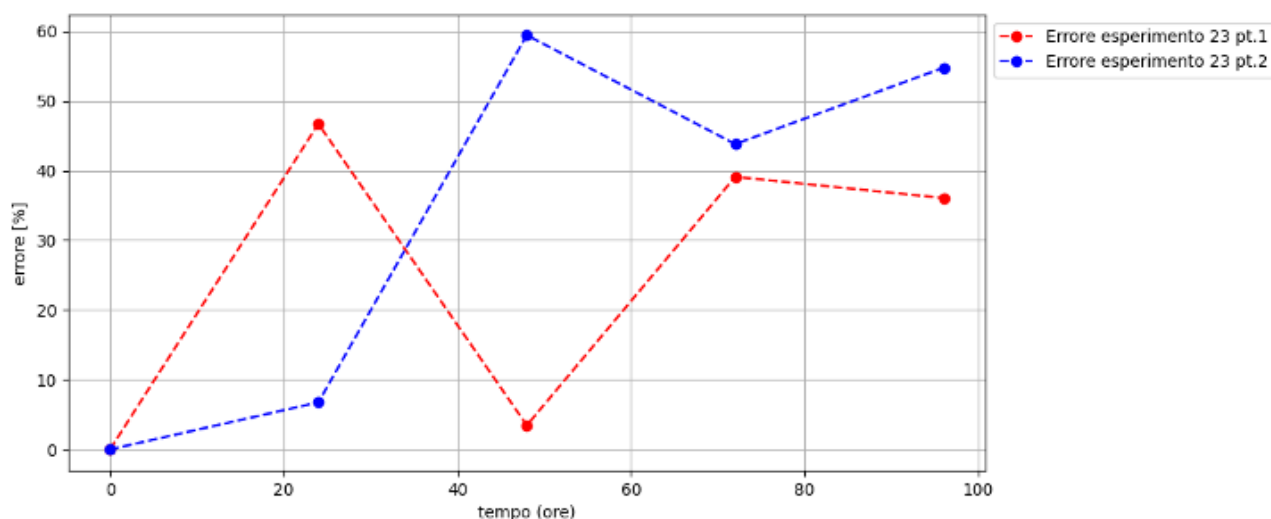


Figura 38. Grafico che mostra l'errore per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $7,60 \cdot 10^{-3}$ $[\mu M]$ dose di farmaco.

Per la dose di farmaco $7,60 \cdot 10^{-3}$ $[\mu M]$ al tempo 48 ore l'errore massimo è del 59,4% e l'errore minimo del 3,5%.

Con il miglior fitting per $\mu_{AC} = 0,0325$ $[ore^{-1}]$ è presente un errore medio del 25% per il primo set di dati del 25% e uno del 33% per il secondo.

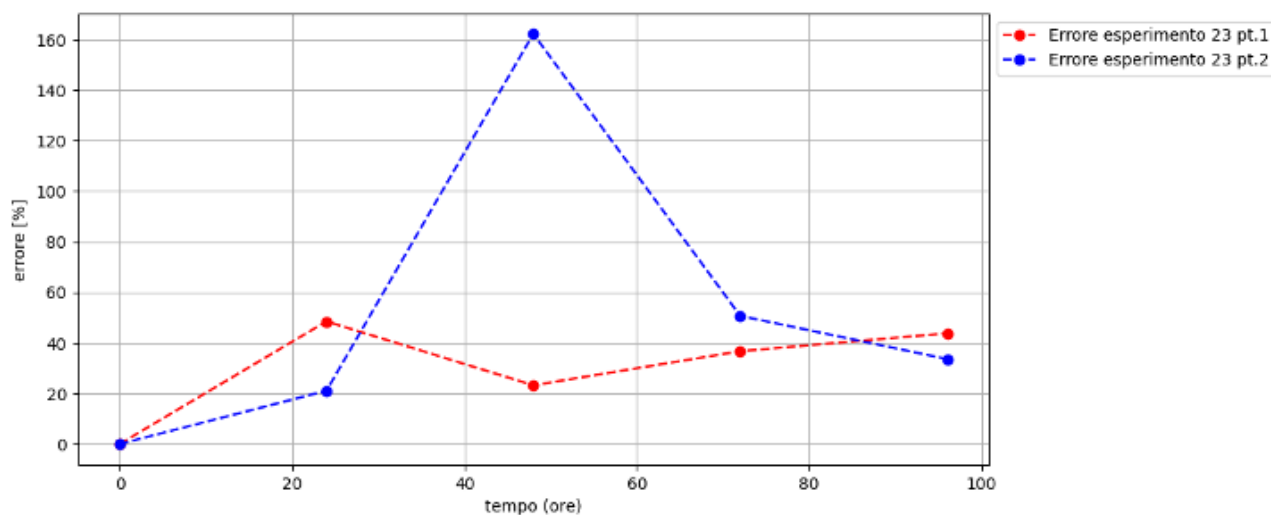


Figura 39. Grafico che mostra l'errore per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,90 \cdot 10^{-2}$ $[\mu M]$ dose di farmaco.

Per la dose di farmaco $1,90 \cdot 10^{-2}$ $[\mu M]$ al tempo 48 ore l'errore massimo è del 162,1% e l'errore minimo del 23,2%.

Con il miglior fitting per $\mu_{AC} = 0,0663$ $[ore^{-1}]$ è presente un errore medio per il primo set di dati del 30,4% e uno del 53,4% per il secondo.

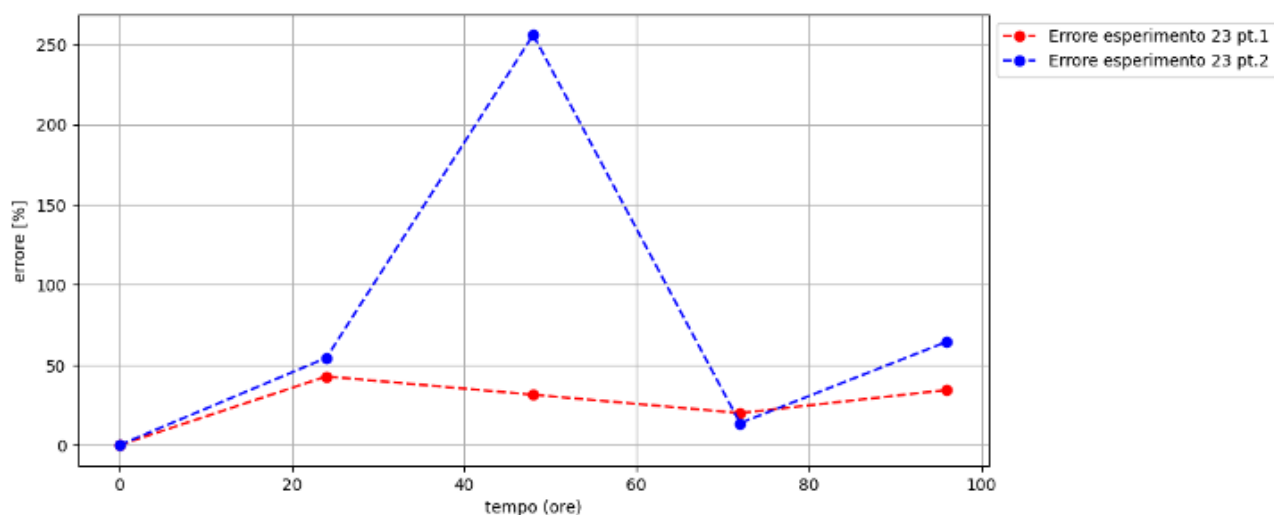


Figura 40. Grafico che mostra l'errore per il tasso di citotossicità μ_{AC}' per l'azione di $3,80 \cdot 10^{-2}$ $[\mu M]$ dose di farmaco.

Per la dose $3,80 \cdot 10^{-2}$ $[\mu M]$ l'errore massimo è del 255,8% al tempo 48 ore e l'errore minimo è del 20% al tempo 72 ore.

Con il miglior fitting per $\mu_{AC} = 0,0864$ $[ore^{-1}]$ è presente un errore medio per il primo set di dati del 25,7% e uno del 77,7% per il secondo.

4. Discussione: interpretazione dei risultati

Dall'analisi di sensitività effettuata sui parametri del modello di Guzev, nella versione implementata in Python, si può affermare che per dosi molto basse o molto alte di farmaco si ha un errore più contenuto rispetto, invece, ai dosaggi intermedi.

In particolar modo, l'aumento di μ_A , l'abbassamento di K e la modifica del parametro d permettono di arrivare ad una condizione più vicina a quella sperimentale: la variazione del limite di crescita ha permesso di modulare l'altezza del grafico in Figura 11, mentre il tasso di morte ha influito sulla sua discesa. L'allargamento della campana e contemporaneamente un minimo aumento del numero massimo di cellule, possono essere causati da uno smaltimento più veloce dovuto al fatto che le cellule riescono ad avere più spazio per proliferare.

Tuttavia, a livello realistico, tale parametro è leggermente semplicistico per descrivere in modo completo la situazione, poiché la ripresa della proliferazione dovrebbe essere rallentata dalla mancanza dei nutrienti.

Nel grafico totale in Figura 10 si mostra la sovrapposizione degli effetti. Per una migliore rappresentazione della curva riportata in letteratura è necessario individuare un parametro che permetta di regolare il numero massimo di cellule nel campione (altezza massima della curva) e un altro parametro che permetta di regolare, in questa situazione particolare ampliare, il tempo di sopravvivenza cellulare. Per effettuare i test sui dati sperimentali forniti, considerando la Gemcitabina come farmaco, è stato necessario tarare i diversi parametri del modello correlati all'azione del farmaco. Come detto in precedenza, oltre ai dati trovati su opportuni siti [11], [12], erano presenti parametri simulati μ_{AC} e μ_{CA} che sono stati tarati in base alle diverse dosi di farmaco utilizzate; ciò avviene sotto l'ipotesi che per ogni cellula tumorale si considerano dalle 10 alle 100 molecole di farmaco.

In generale, dai test effettuati su dati sperimentali, si può evincere che all'abbassarsi della concentrazione del farmaco, il modello riesce a prevedere meglio l'andamento dei dati forniti: la parte finale di ricrescita cellulare viene individuata meglio rispetto a quella iniziale di morte cellulare, sovrastimando, per basse dosi di farmaco, quindi, la concentrazione di cellule vive nel breve termine e aumentando la precisione dell'andamento nel lungo termine.

Si può affermare che, con le dovute accortezze, è possibile plasmare la curva in modo da inseguire bene l'andamento reale, tenendo in considerazione determinati range di correzione dei parametri.

Per stimare correttamente la validità del modello sarebbe necessario avere più risultati sperimentali che permettano di effettuare verifiche su un dataset più grande e quindi caratterizzato da maggiore significatività statistica.

5. Conclusioni

L'obiettivo principale di questa tesi era l'individuazione e l'implementazione di un modello matematico che potesse descrivere le alterazioni nella riproduzione di cellule tumorali in vitro in sospensione in presenza di farmaci chemioterapici.

La ricerca bibliografica iniziale è stata utile per poter contestualizzare la problematica, permettendo di avere un'idea generale sul cancro, sulle diverse tecniche di approccio ad esso e sui diversi modelli ed equazioni utilizzate per prevedere la progressione della malattia e gli esiti delle terapie.

Un'attenta e scrupolosa analisi e classificazione dei documenti trovati ha permesso di arrivare alla scelta del modello matematico più opportuno con le relative equazioni e i parametri richiesti: lo studio effettuato da Guzev [9], [10] sulle cellule A20 sia in presenza che in assenza di Citarabina è risultato quello più completo e appropriato alla descrizione della proliferazione di cellule tumorali in sospensione (tumori liquidi) grazie anche all'utilizzo di specifiche equazioni differenziali che descrivessero nello specifico la dinamica riproduttiva delle cellule vive, cellule morte e la concentrazione del farmaco.

In seguito, per poter testare l'attendibilità del modello, sono stati effettuati diversi test preliminari tramite Python utilizzando i dati presenti in letteratura: lo scopo era riuscire a riprodurre le diverse curve del grafico in Figura 10 facendo uso sia dei dati inseriti nell'articolo dall'autrice sia di valori non esplicitati di parametri trovati con un'accurata analisi di sensitività.

Un altro fattore importante da considerare era la ricerca di un modello in cui fosse possibile cambiare i parametri in base al tipo di cancro preso in esame in modo da poterlo rendere utilizzabile per rappresentare nel medio-lungo termine l'attività citotossica di un qualsiasi farmaco con parametri opportunamente calibrati.

Riuscendo, così, a riprodurre con un margine di errore mediamente basso i risultati ottenuti dalla stessa autrice presa come riferimento, il passo successivo è stato applicare il modello ad una linea cellulare diversa e ad un farmaco differente con dati sperimentali opportunamente forniti: si tratta di esperimenti condotti presso l'Istituto Clinico Humanitas, laboratorio di ricerche oncologiche, su cellule OCI-LY19 in presenza di Gemcitabina.

Dai test effettuati sui dati sperimentali si evince che il modello riesce a prevedere bene il loro andamento, fornendo, così dei risultati attendibili.

Un obiettivo futuro potrebbe essere testare il modello con ulteriori dati sperimentali in modo da ottenere risultati ancora più robusti.

Bibliografia

- [1] "National Cancer Institute." <https://www.cancer.gov/> (accessed Oct. 07, 2022).
- [2] "Our World in Data." <https://ourworldindata.org/> (accessed Oct. 07, 2022).
- [3] E. A. Sausville and D. L. Longo Harrison, "Principi del trattamento dei tumori."
- [4] M. L. Costantino, G. Casagrande, M. Piergiovanni, E. Bianchi, and C. Bernardelli, "Red Blood Cells for Drug Delivery," Aug. 18, 2022
- [5] S. Liuni, "In vitro evaluation of encapsulated chemotherapeutic drugs delivery: static transwells vs dynamic bioreactor for cell-coculture."
- [6] "IFOM." <https://www.ifom.eu/it/ifom-outreach/risorse-digitali/videopillole/videopillole-cellule-tumoriali.php> (accessed Jan. 24, 2023).
- [7] "Cancer Research UK." <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/treatment/drugs/doxorubicin#:~:text=Doxorubicin%20is%20a%20type%20of,combination%20with%20other%20chemotherapy%20drugs>. (accessed Jan. 24, 2023).
- [8] "World Health Organization." <https://www.who.int/> (accessed Oct. 07, 2022).
- [9] E. Guzev, S. Bunimovich-Mendrazitsky, and M. A. Firer, "Differential Response to Cytotoxic Drugs Explains the Dynamics of Leukemic Cell Death: Insights from Experiments and Mathematical Modeling," 2022, doi: 10.3390/sym14061269.
- [10] E. Guzev, G. Luboshits, S. Bunimovich-Mendrazitsky, and M. A. Firer, "Experimental Validation of a Mathematical Model to Describe the Drug Cytotoxicity of Leukemic Cells," 2021, doi: 10.3390/sym13101760.
- [11] "Genomics of Drug Sensitivity in Cancer." <https://www.cancerrxgene.org/> (accessed Jan. 07, 2023).
- [12] B. R. Thompson, J. Shi, H. J. Zhu, and D. E. Smith, "Pharmacokinetics of gemcitabine and its amino acid ester prodrug following intravenous and oral administrations in mice," *Biochem Pharmacol*, vol. 180, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.BCP.2020.114127.
- [13] "Khan Academy." <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/ecology-ap/population-ecology-ap/a/exponential-logistic-growth> (accessed Nov. 06, 2022).
- [14] P. Gerlee, "The model muddle: In search of tumor growth laws," *Cancer Research*, vol. 73, no. 8, pp. 2407–2411, Apr. 15, 2013. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4355.
- [15] H. Murphy, H. Jaafari, and H. M. Dobrovolny, "Differences in predictions of ODE models of tumor growth: a cautionary example," *BMC Cancer*, vol. 16, p. 163, 2016, doi: 10.1186/s12885-016-2164-x.
- [16] P. Unni and P. Seshaiyer, "Mathematical Modeling, Analysis, and Simulation of Tumor Dynamics with Drug Interventions," *Comput Math Methods Med*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4079298.
- [17] D. S. Rodrigues, P. F. A. Mancera, T. Carvalho, and L. F. Gonçalves, "A mathematical model for chemoimmunotherapy of chronic lymphocytic leukemia," *Appl Math Comput*, vol. 349, pp. 118–133, May 2019, doi: 10.1016/J.AMC.2018.12.008.

Appendice A

Parametri della letteratura su farmaco Citarabina

Tabella 1. Parametri basati sui risultati sperimentali relativi al modello delle equazioni

Simbolo	Interpretazione fisica [Unità di misura]	Valore	Referenza
$A(0)$	concentrazione iniziale cellule vive [cellule/mL]	vedere Tabella 2	Sperimentale
$Ad(0)$	concentrazione iniziale cellule morte [cellule/mL]	$5\% \cdot A(0)$	Sperimentale
$C(0)$	concentrazione del farmaco [molecole/mL]	$dose [\mu M] \cdot 6 \cdot 10^{14}$	Sperimentale
t	tempo di coltura [ore]	72	Sperimentale
r	tasso di crescita [ore ⁻¹]	0,07	Sperimentale
K	limite di crescita [cellule/mL]	$4 \cdot 10^6$	Sperimentale
μA	tasso di morte cellulare [ore ⁻¹]	$3,7 \cdot 10^{-8}$	Simulazione
a	dose del farmaco che produce il 50% dell'effetto massimo [μM]	2000	[17]
μAC	tasso di citotossicità del farmaco [ore ⁻¹]	vedere Tabella 3	Simulazione
μCA	tasso di smaltimento del farmaco dovuto all'uccisione delle cellule [ore ⁻¹]	$\mu AC \cdot 10$	Simulazione
μC	tasso di smaltimento del farmaco [ore ⁻¹]	0,231	[17]
d	tasso di smaltimento delle cellule morte [ore ⁻¹]	0,017	Simulazione

Tabella 2. Confronto delle dinamiche di crescita delle cellule CLL [cellule/mL] tra dati sperimentali e simulazioni numeriche

concentrazione iniziale cellule vive $A(0)$ [cellule/mL]	$5 \cdot 10^4$		$1 \cdot 10^4$		$5 \cdot 10^3$	
	Sperimentale	Simulazione	Sperimentale	Simulazione	Sperimentale	Simulazione
48	50000	54054	10000	10070	10000	5228
60	70000	122897	10000	22602	10000	8821
72	100000	273025	10000	50236	10000	14854
84	120000	577722	30000	109941	20000	24948
96	590000	1114930	80000	234397	30000	41736
108	1850000	1862730	80000	477462	40000	69424
120	2580000	2621770	320000	900296	120000	114512
132	3490000	3180420	800000	1509560	130000	186545
144	3650000	3498490	1190000	2184030	550000	298370
156	2440000	3641320	3120000	2732350	820000	464737
168	2320000	3654730	3070000	3052090	1030000	697464
180	2020000	3500150	2950000	3162600	1300000	996212
192	1710000	3062170	2760000	3125520	1440000	1338190
204	1550000	2364930	2120000	2990300	1600000	1676040
216	1450000	1672210	2020000	2785060	1770000	1951030
228	1240000	1149160	1900000	2523550	1980000	2114600
240	960000	779597	1540000	2212900	2160000	2141610
252	870000	551455	1240000	1859650	2050000	2029460
264	850000	388608	1030000	1474810	1900000	1791020
276	720000	276498	980000	1078450	1440000	1451290
288	500000	198206	750000	702772	1030000	1050550
300	210000	142884	520000	388800	880000	648799
312	50000	103435	160000	171158	240000	318579

Tabella 3. Effetto simulato del farmaco Citarabina sui parametri di crescita delle cellule A20

Concentrazioni Citarabina [μM]	μAC [ore ⁻¹]	Numero di cellule alla 72esima ora [cellule/mL]	Inibizione della crescita cellulare [%]
0	-	1646260	0
6,25	0,046	85683	94,8
3,125	0,0322	168014	89,8
1,5625	0,0225	291671	82,3
0,78	0,0158	452951	72,5
0,39	0,011	637807	61,3
0,195	0,0077	827114	49,7
0,098	0,0054	1003650	39
0,049	0,0038	1156420	29,7
0,024	0,0026	1281250	22,2
0,012	0,0018	1378920	16,2
0,006	0,0013	1452970	11,7

Tabella 4. Confronto dell'inibizione della crescita cellulare [%] tra dati sperimentali e simulazioni numeriche

Concentrazioni Citarabina [μM]	Sperimentale	Simulazione
6.25	95,2	94,8
3.125	93,5	89,8
15.625	88,7	82,3
0.78	87	72,5
0.39	85,2	61,3
0.195	80,5	49,7
0.098	66,25	39
0.049	29,5	29,7
0.024	18,9	22,2
0.012	14,5	16,2
0.006	7,7	11,7

Parametri sperimentali su farmaco Gemcitabina

Tabella 5. Tabella dei parametri per il farmaco Gemcitabina al modello delle equazioni

Simbolo	Interpretazione fisica [Unità di misura]	Valore	Referenza
$A(0)$	concentrazione iniziale cellule vive [cellule/mL]	100000	Sperimentale
$Ad(0)$	concentrazione iniziale cellule morte [cellule/mL]	4362	Sperimentale
$C(0)$	concentrazione del farmaco [molecole/mL]	$dose [\mu M] \cdot 6 \cdot 10^{14}$	Sperimentale
t	tempo di coltura [ore]	96	Sperimentale
r	tasso di crescita [ore ⁻¹]	0,032	Simulazione
K	limite di crescita [cellule/mL]	$4 \cdot 10^6$	Simulazione
μA	tasso di morte cellulare [ore ⁻¹]	$3,7 \cdot 10^{-8}$	Simulazione
a	dose del farmaco che produce il 50% dell'effetto massimo [μM]	0,002438	[11]
μAC	tasso di citotossicità del farmaco [ore ⁻¹]	dipende dalla dose di farmaco	Simulazione
μCA	tasso di smaltimento del farmaco dovuto all'uccisione delle cellule [ore ⁻¹]	$\mu AC \cdot 10$	Simulazione
μC	tasso di smaltimento del farmaco [ore ⁻¹]	0,4423	Sperimentale
d	tasso di smaltimento delle cellule morte [ore ⁻¹]	0,017	Simulazione

Tabella 6. Dati esperimento 22 senza farmaco

tempo [ore]	numero totale di cellule [cellule]	% vive	% morte	vive [cellule/mL]	morte [cellule/mL]
0 (al momento della semina)	156544	95,82	4,18	100000	4362
24	146667	49,30	3,40	48205	3324
48	583333	78,80	3,00	306444	11667
72	953333	77,70	1,80	493826	11440

Tabella 7. Dati esperimento 23 senza farmaco

tempo [ore]	numero totale di cellule [cellule]	% vive	% morte	vive [cellule/mL]	morte [cellule/mL]
0 (al momento della semina)	156544	95,82	4,18	100000	4362
24	166667	93,70	4,90	104111	5444
48	426667	95,50	2,60	271645	7396
72	1230000	96,40	0,40	790480	3280
96	2113333	95,80	0,80	1349715	11271

Tabella 8. Dati esperimento 23 dose di farmaco: $1,14 \cdot 10^{-3} [\mu M]$

	tempo [ore]	numero totale di cellule [cellule]	% vive	% morte	vive [cellule/mL]	morte [cellule/mL]
	0 (al momento della semina)	156544	95,82	4,18	100000	4362
Parte 1	24	250000	70,30	24,9	117167	41500
Parte 2		220000	75,10	18,7	110147	27427
Parte 1	48	330000	93,30	4,6	205260	10120
Parte 2		240000	78,10	19,5	124960	31200
Parte 1	72	850000	94,50	3,6	535500	20400
Parte 2		470000	91,80	5,9	287640	18487
Parte 1	96	1550000	93,00	2,7	961000	27900
Parte 2		930000	94,60	1,7	586520	10540

Tabella 9. Dati esperimento 23 dose di farmaco: $1,90 \cdot 10^{-3} [\mu M]$

	tempo [ore]	numero totale di cellule [cellule]	% vive	% morte	vive [cellule/mL]	morte [cellule/mL]
	0 (al momento della semina)	156544	95,82	4,18	100000	4362
Parte 1	24	260000	61,00	29,40	105733	50960
Parte 2		250000	75,10	18,70	125167	31167
Parte 1	48	290000	94,40	1,60	182507	3093
Parte 2		280000	78,10	19,50	145787	36400
Parte 1	72	810000	93,80	3,60	506520	19440
Parte 2		600000	91,80	5,90	367200	23600
Parte 1	96	1480000	94,10	2,30	928453	22693
Parte 2		1250000	94,60	1,70	788333	14167

Tabella 10. Dati esperimento 23 dose di farmaco: $7,60 \cdot 10^{-3} [\mu M]$

	tempo [ore]	numero totale di cellule [cellule]	% vive	% morte	vive [cellule/mL]	morte [cellule/mL]
	0 (al momento della semina)	156544	95,82	4,18	100000	4362
Parte 1	24	220000	44,00	42,20	64533	61893
Parte 2		280000	47,50	44,00	88667	82133
Parte 1	48	200000	67,50	28,30	90000	37733
Parte 2		170000	48,10	46,60	54513	52813
Parte 1	72	400000	83,80	11,00	223467	29333
Parte 2		400000	90,80	6,00	242133	16000
Parte 1	96	610000	88,90	5,30	361527	21553
Parte 2		860000	89,10	5,10	510840	29240

Tabella 11. Dati esperimento 23 dose di farmaco: $1,90 \cdot 10^{-2} [\mu M]$

	tempo [ore]	numero totale di cellule [cellule]	% vive	% morte	vive [cellule/mL]	morte [cellule/mL]
	0 (al momento della semina)	156544	95,82	4,18	100000	4362
Parte 1	24	410000	34,80	55,70	95120	152247
Parte 2		210000	28,90	60,90	40460	85260
Parte 1	48	150000	30,50	42,70	30500	42700
Parte 2		100000	13,40	78,50	8933	52333
Parte 1	72	170000	37,10	57,80	42047	65507
Parte 2		160000	50,60	44,10	53973	47040
Parte 1	96	170000	72,70	15,60	82393	17680
Parte 2		160000	65,40	24,90	69760	26560

Tabella 12. Dati esperimento 23 dose di farmaco: $3,80 \cdot 10^{-2} [\mu M]$

	tempo [ore]	numero totale di cellule [cellule]	% vive	% morte	vive [cellule/mL]	morte [cellule/mL]
	0 (al momento della semina)	156544	95,82	4,18	100000	4362
Parte 1	24	500000	17,40	64,00	58000	213333
Parte 2		110000	29,30	58,60	21487	42973
Parte 1	48	160000	7,70	74,60	8213	79573
Parte 2		70000	6,50	84,60	3033	39480
Parte 1	72	130000	11,80	82,90	10227	71847
Parte 2		90000	15,80	76,80	9480	46080
Parte 1	96	160000	20,50	75,80	21867	80853
Parte 2		70000	18,70	35,50	8727	16567

Appendice B

Codice Python

Funzione per la risoluzione del sistema di equazioni con il metodo di Runge-Kutta esplicito del quarto ordine (RK45):

```
sol = solve_ivp(lambda t, x: f(t, x),
                 [t[0], t[-1]], x0, method = "RK45", t_eval = t,
                 rtol = 3e-14, max_step = 2)
```

Funzione per la risoluzione del sistema di equazioni con metodo implicito di ordine variabile, utilizzato quando RK45 non riesce a computare:

```
sol = solve_ivp(lambda t, x: f(t, x),
                 [t[0], t[-1]], x0, method = "BDF", t_eval = t,
                 rtol = 3e-14)
```

Definizione equazione e costanti usate:

```
def f(t, x):

    #cellule vive
    A = c[0]*x[0]*(1 - (x[0] / c[1])) - c[2]*x[0]*x[1] -
        ((muAC*x[0]*x[2]) / (c[3] + x[2]))

    #cellule morte
    D = c[2]*x[0]*x[1] - c[5]*x[1] + ((muAC*x[0]*x[2]) /
        (c[3] + x[2]))

    #concentrazione farmaco
    C = -c[4]*x[2] - ((muCA*x[2]*x[0]) / (c[3] + x[2]))

    dxdt = [A, D, C]
    return dxdt

#costanti
c = [r, K, muA, a, muC, d]

#condizioni iniziali; dose in micro molare [muM]
x0 = [A0, D0, dose*6e14]
t = np.linspace(0, 96, 1000000)
```

Lista delle figure

Figura 1. Scrematura articoli trovati in seguito all'inserimento delle parole chiave.	13
Figura 2. Grafico a torta che mostra la tipologia di modello trovato.	14
Figura 3. Grafico che mostra la crescita esponenziale di una popolazione nel tempo.	15
Figura 4. Grafico che mostra la crescita logistica di una popolazione nel tempo.	16
Figura 5. Grafico che mostra la crescita secondo l'equazione di Gompertz di una popolazione nel tempo.	17
Figura 6. Grafico a torta che mostra la forma del tumore studiato negli articoli.	18
Figura 7. Grafico a torta che mostra i parametri considerati negli articoli.	18
Figura 8. Grafico a torta che mostra i farmaci utilizzati negli articoli.	18
Figura 9. Grafico a torta che mostra la tipologia di modello del farmaco trovato negli articoli.	18
Figura 10. Grafico dell'articolo di Guzev: evoluzione temporale di cellule A20 vive (linee solide) e dei dati sperimentali reali di cellule A20 in vitro (linee tratteggiate) a diverse concentrazioni cellulari iniziali.	21
Figura 11. Grafico che mostra la validazione del modello senza farmaco.	21
Figura 12. Grafico che mostra l'errore tra i risultati ottenuti e quelli dell'articolo di Guzev senza considerare l'effetto del farmaco con una concentrazione di cellule iniziali pari a $5 \cdot 10^4$ cellule/mL.	22
Figura 13. Grafico che mostra l'errore tra i risultati ottenuti e quelli dell'articolo di Guzev senza considerare l'effetto del farmaco con una concentrazione di cellule iniziali pari a $1 \cdot 10^4$ cellule/mL.	22
Figura 14. Grafico che mostra l'errore tra i risultati ottenuti e quelli dell'articolo di Guzev senza considerare l'effetto del farmaco con una concentrazione di cellule iniziali pari a $5 \cdot 10^3$ cellule/mL.	23
Figura 15. Grafico dell'articolo di Guzev che mostra l'effetto del farmaco Citarabina in 72 ore.	23
Figura 16. Grafico che mostra l'effetto del farmaco nel tempo in 72 ore.	24
Figura 17. Grafico che mostra l'errore per ogni dose di farmaco.	24
Figura 18. Grafico che mostra la sensitività delle cellule vive iniziali senza farmaco.	25
Figura 19. Grafico che mostra la sensitività delle cellule morte iniziali senza farmaco.	25
Figura 20. Grafico che mostra la sensitività del tasso di crescita ' r ' senza farmaco.	26
Figura 21. Grafico che mostra la sensitività del limite di crescita ' K ' senza farmaco.	27
Figura 22. Grafico che mostra la sensitività del tasso di morte ' μA ' senza farmaco.	27
Figura 23. Grafico che mostra la sensitività del tasso di smaltimento di cellule morte ' d ' senza farmaco.	28
Figura 24. Grafico dell'esperimento 22 che mostra la sensitività del limite di crescita ' K ' con tasso di crescita ' r ' sperimentale.	29
Figura 25. Grafico dell'esperimento 23 che mostra la sensitività del limite di crescita ' K ' con tasso di crescita ' r ' sperimentale.	29
Figura 26. Grafico dell'esperimento 22 che mostra la sensitività del tasso di morte ' μA ' con tasso di crescita ' r ' sperimentale.	30
Figura 27. Grafico dell'esperimento 23 che mostra la sensitività del tasso di morte ' μA ' con tasso di crescita ' r ' sperimentale.	30
Figura 28. Grafico che mostra la combinazione degli effetti: limite di crescita ' K ' con tasso di morte ' μA ' e tasso di crescita ' r ' sperimentale.	31
Figura 29. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di crescita ' r '.	31
Figura 30. Grafico che mostra l'errore per ogni valore del tasso di crescita ' r '.	32

Figura 31. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,14 \cdot 10^{-3}$ [μM] dose di farmaco.	32
Figura 32. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,90 \cdot 10^{-3}$ [μM] dose di farmaco.	33
Figura 33. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $7,60 \cdot 10^{-3}$ [μM] dose di farmaco.	33
Figura 34. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,90 \cdot 10^{-2}$ [μM] dose di farmaco.	34
Figura 35. Grafico che mostra il miglior fitting per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $3,80 \cdot 10^{-2}$ [μM] dose di farmaco.	34
Figura 36. Grafico che mostra l'errore per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,14 \cdot 10^{-3}$ [μM] dose di farmaco.	35
Figura 37. Grafico che mostra l'errore per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,90 \cdot 10^{-3}$ [μM] dose di farmaco.	35
Figura 38. Grafico che mostra l'errore per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $7,60 \cdot 10^{-3}$ [μM] dose di farmaco.	36
Figura 39. Grafico che mostra l'errore per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $1,90 \cdot 10^{-2}$ [μM] dose di farmaco.	36
Figura 40. Grafico che mostra l'errore per il tasso di citotossicità ' μ_{AC} ' per l'azione di $3,80 \cdot 10^{-2}$ [μM] dose di farmaco.	37