



**Politecnico
di Torino**

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Matematica

Sessione di laurea Ottobre 2023

INTERAZIONE TRA CELLULE IMMUNITARIE E CELLULE TUMORALI SU CHIP MICRO-FLUIDICI

Relatore

Prof. Luigi Preziosi

Relatore esterno

Dr. Gabriella Bretti (IAC-CNR)

Candidato

Alessia Ferrante

Anno Accademico 2022-2023

Indice

1. Introduzione	2
1.1. Biologia delle interazioni	4
1.2. Esperimenti biologici	9
2. Modello matematico	16
2.1. Analisi qualitativa del modello matematico	18
2.1.1 Comportamento asintotico	18
2.1.2. Stabilità del modello	31
3. Simulazioni numeriche e risultati	35
3.1. Definizioni differenti della funzione di sensibilità $\chi(\varphi)$	38
3.1.1. Modello base della funzione di sensibilità chemiotattica $\chi(\varphi)$	38
3.1.2. Saturazione del recettore nella funzione di sensibilità $\chi(\varphi)$	43
3.1.3. Sovraffollamento cellulare modellizzato dalla funzione di sensibilità $\chi(\varphi)$	48
3.2. Scenari possibili	53
3.2.1. Cellule tumorali non trattate	53
3.2.2. Cellule tumorali precedentemente trattate	58
4. Conclusioni	64
Bibliografia	65

1. Introduzione

I recenti esperimenti sull'interazione cellulare effettuati su chip microfluidici hanno avviato un processo di ricerca nel settore, accompagnato dalla costruzione di modelli matematici adatti alla descrizione del fenomeno.

I chip microfluidici rappresentano un approccio innovativo nell'ambito sperimentale e consentono di aumentare la complessità degli esperimenti *in vitro*, riproducendo un sistema sviluppato *in vivo* [4]. Tale necessità nasce dall'esigenza di compensare alcune lacune generate dalle diverse tipologie di esperimenti:

- le sperimentazioni condotte *in vivo* riproducono fenomeni biologici caratterizzanti l'intero organismo e dunque risulta particolarmente complesso estrapolare dei dati;
- in alternativa, è possibile adoperare esperimenti *in vitro*, nei quali le colture cellulari sviluppate in laboratorio sono specifiche di una parte dell'organismo e sono introdotte all'interno di provette.

L'unicità cellulare proveniente dagli esperimenti *in vitro* permette lo sviluppo di studi dettagliati su alcune componenti dell'organismo e sulla loro interazione, ma talvolta i risultati ottenuti non sono perfettamente comparabili con quelli ricavati da esperimenti *in vivo*.

Col fine di migliorare le osservazioni generate *in vitro*, sono state introdotte delle sperimentazioni su chip micro-fluidici.

Le applicazioni nel settore biologico di tale approccio sono numerose e coinvolgono diverse ricerche sugli organi, quali il fegato, i polmoni, il cervello e il cuore ([3] e [5]).

In questo ambito, particolarmente rilevante risulta l'apporto fornito agli studi nel settore tumorale e più in generale la relazione tra l'invasione tumorale e la risposta immunitaria elaborata dall'organismo [6].

Il suddetto lavoro è focalizzato sulla considerazione di due particolari specie cellulari interagenti: cellule tumorali e cellule immunitarie, confinate inizialmente in due settori differenti.

Il chip costruito per valutare il modello individuato è una semplificazione del dominio adoperato in laboratorio: si tratta di due camere rettangolari nelle quali sono in principio inserite le concentrazioni di cellule (a sinistra le cellule tumorali in adesione e a destra giungono le cellule immunitarie), collegate da una certa quantità di micro-canali, nei quali avviene il passaggio cellulare e dunque l'interazione.

Gli scenari analizzati sono i seguenti:

- le cellule tumorali sono precedentemente trattate mediante l'utilizzo di un farmaco chemioterapico allo scopo di stimolare gli aggregati tumorali a produrre segnali chimici di attivazione della risposta immunitaria. Tale trattamento induce la morte immunologica delle cellule maligne [16];
- nessun fattore chimico aggiuntivo è introdotto nel sistema in analisi e la componente tumorale non rilascia alcun segnale di riconoscimento, per cui è possibile esaminare l'immediata diffusione degli aggregati tumorali in presenza di cellule immunitarie "dormienti".

Nella ricerca effettuata, è dapprima presentato il caso trattato con analisi delle differenti definizioni da associare alla componente chemiotattica. Ciò favorisce la valutazione della risposta e dell'attività delle cellule immunitarie ad un preciso segnale emesso dagli aggregati tumorali.

Successivamente, è mostrata una comparazione tra i due scenari possibili (trattamento o assenza di segnale chimico), evidenziando le differenze riscontrate nell'operato dei macrofagi e delle cellule maligne.

Da un punto di vista matematico, per poter descrivere al meglio il comportamento delle cellule, è stato implementato un sistema di equazioni di diffusione-reazione con l'aggiunta della *chemotaxis*, introdotta per simulare il processo migratorio delle cellule, rendendo il modello quanto più aderente all'esperimento.

Lo sviluppo di sperimentazioni su chip coinvolge milioni di cellule disposte sulla geometria, per cui i modelli discreti particellari permettono di descrivere in modo più accurato le forze d'interazione cellulare e gli effetti su scala microscopica, ma con i modelli macroscopici si possono modellizzare le dinamiche cellulari di immunocompetenza in porzioni di tessuti invasi da cellule tumorali. Per tale motivo si è scelto un modello continuo per analizzare le attività osservate nell'esperimento *cancer on chip*.

Al fine di attuare le simulazioni necessarie a riprodurre il fenomeno, il modello applicato alla geometria è una modifica a quello proposto da *Keller-Segel* [2] in 2D: un modello parabolico che tiene conto del rilascio di segnali chimici da parte delle cellule e della loro interazione.

La produzione di questi fattori chemiotattici, quali le citochine e le chemochine, favorisce lo sviluppo di una capacità di sorveglianza sulle componenti cellulari maligne da parte delle cellule immunitarie durante il fenomeno migratorio.

Da ciò scaturisce l'interesse dei ricercatori nel considerare la relazione che intercorre tra questi due compartimenti cellulari interagenti.

1.1. Biologia delle interazioni

Nel corso del *XIX* secolo è emersa l'esigenza di sfruttare il sistema immunitario per contrastare lo sviluppo dei tumori, noti i benefici da esso prodotti. I primi ad occuparsene sono stati *Wilhelm Busch* e *Friedrich Fehleisen*, osservando come l'erisipela, una malattia cutanea infettiva e contagiosa derivante da streptococchi, sia spontaneamente regredita, in seguito al contatto diretto con le cellule immunitarie.

Successivamente, *William Coley* ha finalizzato una terapia a base di immunostimolanti, riscontrando ottimi risultati per pazienti affetti da varie tipologie di cancro [12].

Questo trattamento non è diventato di pratica comune, in quanto non è sempre riproducibile. Tale problematica è risolta con l'introduzione della radioterapia e degli agenti chemioterapici, che distolgono l'attenzione dei ricercatori dall'indagine biologica tra sistema immunitario e sviluppo tumorale.

Durante lo scorso secolo, l'analisi del sistema immunitario in relazione al sarcoma è nuovamente oggetto di ricerca da parte degli studiosi, in seguito a nuovi apporti alla medicina e biologia forniti dai modelli murini.

Gli aggregati tumorali si sviluppano a causa di una perdita di normale regolamentazione dei processi che coinvolgono le cellule, quali la proliferazione e l'apoptosi (morte programmata). In seguito a ciò, le cellule, ormai incontrollate, modificano il micro-ambiente all'interno del quale si espandono, favorendone la loro sopravvivenza.

In un primo momento, le cellule "anomale" costituiscono piccoli aggregati localizzati senza accesso alla rete vascolare, ricevendo così nutrienti e ossigeno necessari alla loro alimentazione dal tessuto sano che le ospita, causando dunque ipossia (mancanza di ossigeno). L'accumulo di cellule tumorali accompagnate da una incessante richiesta di ossigenazione, induce gli aggregati ad una vascolarizzazione nel sistema circolatorio già presente.

Talvolta, il sistema vascolare già esistente non è ancora sufficiente. Dunque, le cellule producono dei fattori pro-angiogenici: tra i principali, vi è il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF). Ciò costituisce l'input per l'angiogenesi, ovvero la formazione di nuovi vasi sanguigni, a partire da quelli già in vigore. Tale processo avviene normalmente nell'organismo, ad esempio durante la guarigione di una ferita, ma nel caso del cancro, i vasi sanguigni generati sono imperfetti.

In ultima battuta, il tumore può ingrandirsi ed invadere, tramite la vascolarizzazione, i tessuti circostanti, rilasciando piccoli aggregati cellulari che possono stanziarsi in nuovi organi, generando così la fase più devastante ed imprevedibile: la metastasi [13].

Gli aggregati cellulari che compongono i tumori, nella maggior parte dei casi, sono approssimati come degli sferoidi multicellulari costituiti dalle seguenti sezioni:

- nucleo necrotico: le cellule risultano poco mobili, ma altamente proliferanti;
- zona quiescente: le cellule sono pressoché inattive;
- bordo altamente mobile: le cellule, a causa della loro elevata mobilità, sono in grado di staccarsi dal corpo centrale della massa ed invadere il tessuto circostante.

Un esempio è riportato nella figura 1, che mostra la sezione di un polmone di criceto. Si osserva come in questo particolare caso, il tumore assuma una forma simile a quella di

una circonferenza, essendo in due dimensioni, e gli strati appena elencati siano ben distinti [14].

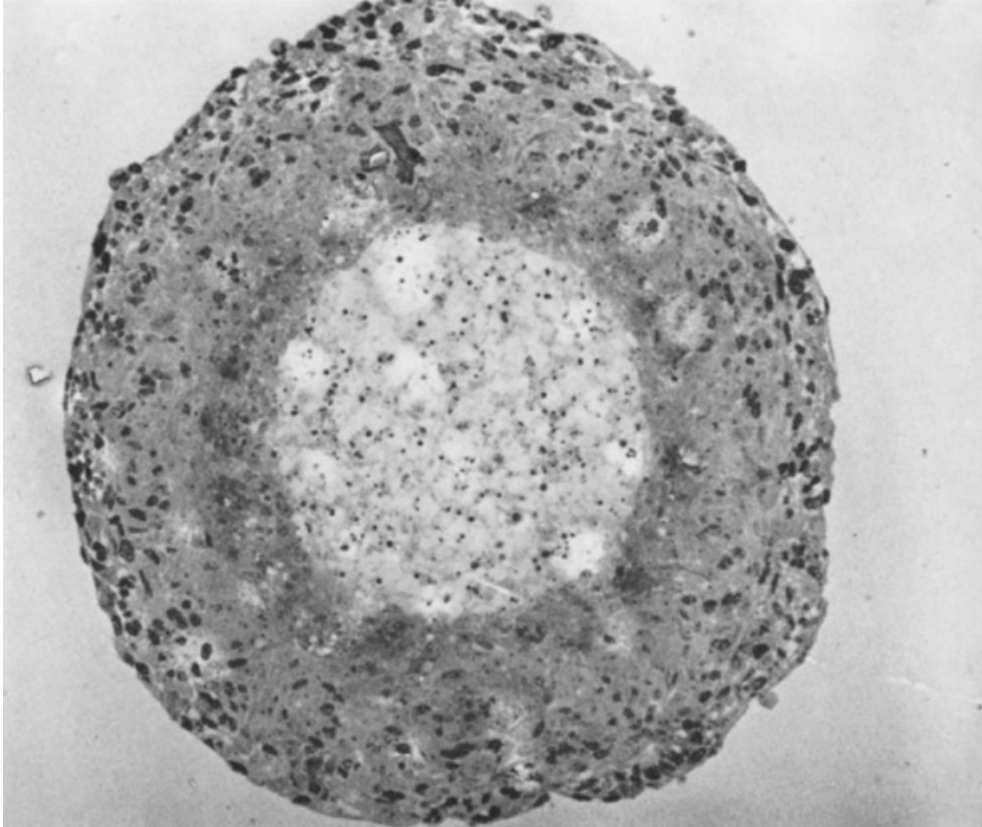


Figura 1: Sezione di uno sferoide tumorale rinvenuto in un polmone di criceto cinese di diametro pari a 1mm e tempo di vita stimato: 20 giorni [14].

A causa della presenza di uno strato esterno altamente mobile, le cellule tendono ad invadere i tessuti circostanti; in una fase pre-metastatica, affinché l'invasione sia compiuta, è necessario che si generino legami cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare ben consolidati (Vedi **Fig. 2**).

Le cellule tumorali, entrate a contatto con le cellule del nuovo tessuto sano da colonizzare, rilasciano degli enzimi che degradano la matrice extracellulare (Metalloproteinasi o MMPs), facilitandone così l'invasione.

Esistono differenti tipologie di cancro, ma le varie analisi hanno evidenziato delle caratteristiche comuni:

- crescita incontrollata;
- resistenza all'apoptosi;

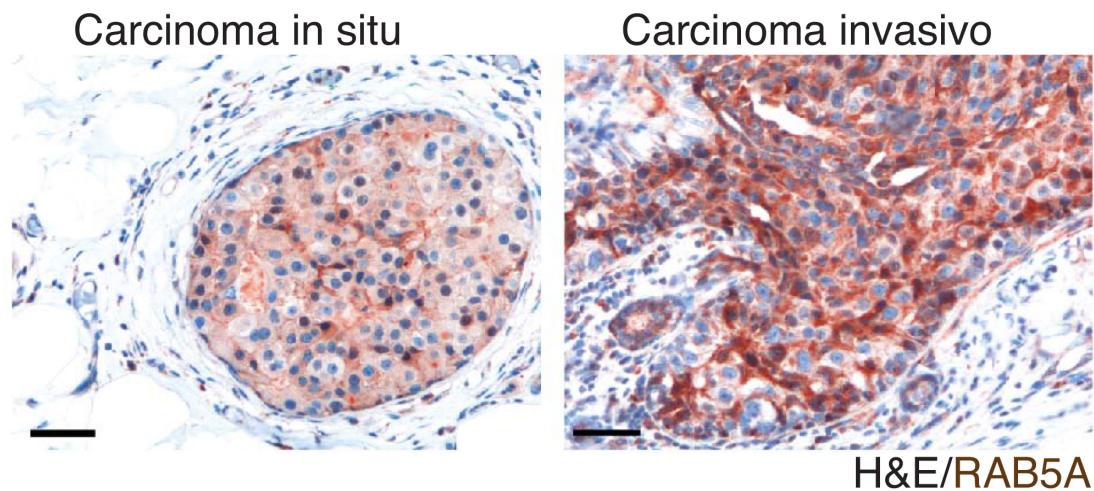


Figura 2: Fase invasiva del tumore: a sinistra è mostrato un carcinoma mammario localizzato (*in situ*) con piccole quantità di fattore di fluidificazione RAB5A; a destra, il medesimo cancro ha attraversato le pareti, invadendo il tessuto circostante, aiutato da una elevata produzione di RAB5A.

- proliferazione incessante;
- angiogenesi ed invasione tissutale;
- metastasi.

Dunque sulla base di ciò, la matematica svolge un ruolo fondamentale nella costruzione di modelli volti a ridurre la sofferenza del paziente ed aumentare l'efficacia della terapia proposta.

Col medesimo fine, i ricercatori hanno ritenuto di rilevante importanza l'accostamento tra le cellule tumorali ed il sistema immunitario.

Nel settore dell'immunologia, durante gli anni '60, è emerso l'interesse verso due tipologie differenti di linfociti, cellule caratterizzanti il sistema immunitario adattativo:

- linfociti B;
- linfociti T.

I primi svolgono il ruolo di riconoscimento dell'antigene circolante nel suo stato primordiale e producono anticorpi protettivi. Mentre i linfociti T si occupano degli antigeni peptidici, ovvero derivanti da proteine degradate, mediante un processo noto come presentazione dell'antigene: durante questa fase, affinché l'individuazione vada a buon fine, gli antigeni entrano a contatto con le molecole MHC, che favoriscono l'azione dei linfociti T.

I linfociti T sono costituiti da due classi di recettori che si occupano della parte esecutiva dell'azione immunitaria: in primo luogo vi sono i linfociti T CD4 che riconoscono l'antigene tramite le cellule MHC della classe II, ovvero cellule dendritiche sviluppate in seguito

ad infezioni, e stimolano il sistema immunitario alla produzione di citochine con scopo chemioterapico.

Mentre i linfociti T CD8 agiscono nei confronti dell'antigene compatibile con le cellule MHC di classe I, cellule nucleate che svolgono il compito di individuare infezioni di tipo virale o tumorale.

A differenza dei precedenti, questi ultimi stimolano reazioni volte ad eliminare gli agenti patogeni.

Il riconoscimento da parte dei linfociti T degli antigeni avviene tramite il TCR: si tratta del recettore delle cellule T costituito da complesse catene proteiche che individuano gli specifici antigeni.

Esso contribuisce all'attivazione e allo sviluppo dei linfociti T, ma, affinché il lavoro di stimolazione del sistema immunitario sia completato, è necessario un ulteriore processo di co-stimolazione. Tra le principali proteine che si occupano di ciò, vi è la proteina di superficie non polimorfa CD28.

Questa, se non opportunamente controllata, può generare una sovra produzione, non richiesta, di linfociti T. Il sistema risponde producendo delle molecole inibitorie, quali le proteine 4 associate ai linfociti T citotossici (CTLA4), e la morte programmata (PD1).

A seguito dell'attivazione, le cellule T presentano tre destini differenti nel sistema periferico, come mostrato in figura 3:

1. apoptosi causata dal ritiro delle citochine, che avviene a risposta immunitaria compiuta o a causa della incessante re-stimolazione per dosi elevate;
2. re-stimolazione a basse dosi, che generano un fenotipo delle cellule T esaurito;
3. azione di memoria immunologica.

I linfociti T di memoria sono i più efficaci, in quanto a lungo termine sono in grado di riconoscere ed intervenire con immediatezza in presenza di agenti patogeni e tumori.

A tal fine l'immunoterapia costituisce un vantaggioso apporto agli studi nel settore tumorale [12].

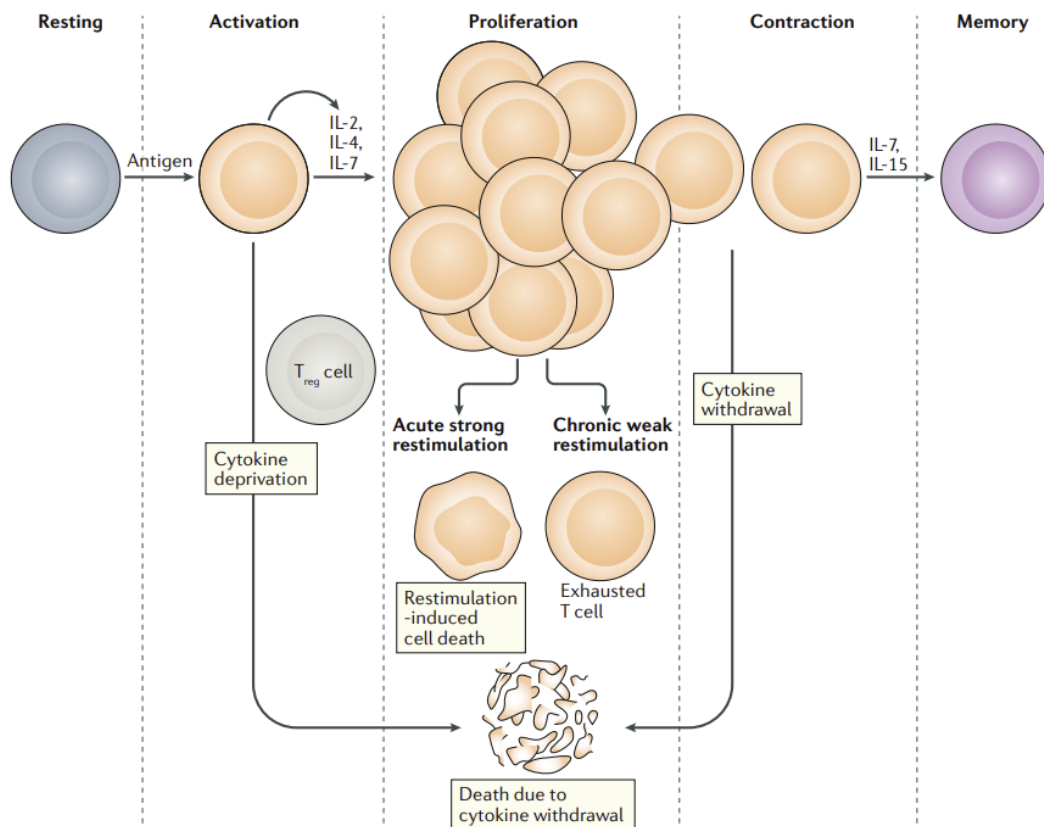


Figura 3: I tre differenti destini delle cellule T periferiche: a seguito della stimolazione da parte dell'antigene, le cellule T consumano citochine (IL-2, IL-4 e IL-7) per poter proliferare e generare una risposta immunitaria. Le molecole inibitorie nel caso di sovra produzione possono agire, inducendo le cellule T ad apoptosi. Le cellule T sopravvissute subiscono le conseguenze sopra citate a seconda dell'ambiente nel quale vivono [12].

1.2. Esperimenti biologici

Lo studio delle malattie che invadono il corpo umano è un processo estremamente arduo, data la complessità dell'organismo in questione. Ma, le continue scoperte a livello biologico favoriscono lo sviluppo di nuove terapie atte a ridurre (o in alcuni casi, debellare) gli effetti della patologia.

Attualmente, ancora molte sono le incognite legate alla descrizione completa delle infermità: una ricerca approfondita richiede tempistiche molto lunghe, affinché il risultato ottenuto contribuisca alla risoluzione del problema. Talvolta, l'esperimento potrebbe generare forti discordanze con la realtà ed impedire il raggiungimento dell'obiettivo prefissato. Una delle principali cause della discordanza è dovuta alle colture cellulari introdotte per effettuare la sperimentazione: generalmente, gli esperimenti sono condotti adoperando cellule di natura animale.

Seppur l'uomo abbia in comune molte caratteristiche con la specie animale, numerose sono le diversità presenti. Infatti, gli esperimenti condotti tramite cellule animali hanno contribuito fortemente alla conoscenza e scoperta di aspetti della fisiologia dell'organo umano e di alcune patologie che possono invaderlo, sviluppando trattamenti e farmaci volti a contrastare il problema.

I ricercatori, però, hanno riscontrato delle differenze tra gli studi condotti sugli animali e i corrispondenti effettuati sugli umani; infatti, alcuni farmaci testati sulle cellule animali risultano tossici o privi di efficacia, aspetti che potrebbe non verificarsi in presenza di cellule umane.

I casi in cui queste problematiche si verificano, presentano delle percentuali rilevanti, dunque gli studiosi muovono in una direzione differente, volta a sviluppare esperimenti *in vitro* che definiscano farmaci e trattamenti adatti alla gestione delle infermità umane.

L'alternativa avanzata negli ultimi decenni agli studi animali, è la trattazione delle cellule e dei tessuti umani su chip micro-fluidici. Questi riproducono al meglio la struttura fisiologica di molti organi umani, quali ad esempio, i polmoni (simulati per primi come "*organs-on-chip*" (*OOC*)), l'intestino, il rene, la pelle e il midollo osseo [3][4][5][11].

Il chip è costituito da un materiale trasparente, come plastica o vetro o polimeri flessibili (polidimetilsilossano), al cui interno sono presenti micro-canali cavi rivestiti da cellule specifiche degli organi dei quali è necessario conoscere il comportamento.

Essendo la struttura molto piccola e traslucida, essa consente di analizzare a livello molecolare e cellulare l'attività di alcune specifiche zone dell'organismo, individuandone eventuali aspetti patologici.

Questo "semplice" *setting* può essere integrato, introducendo delle forze meccaniche che simulano il moto degli organi, ad esempio, la contrazione e la dilatazione dei polmoni durante la fase di respirazione.

La complessità è estesa a casi in cui l'obiettivo è quello di riprodurre interi tessuti su chip ("*tissue chips*"): più canali sono rivestiti da cellule di uno stesso tessuto e diversi canali legati a differenti tessuti possono interagire tra loro mediante una membrana porosa o un gel (**Fig. 4**).

La ricerca si spinge oltre la connessione di più tessuti, infatti sono state generate delle piattaforme automatizzate per collegare più OOC, ricreando la relazione tra i diversi organi che compongono il corpo umano ("*human Body-on-chips*") (**Fig. 5**).

Su questi particolari chip, le cellule sopravvivono anche per lunghi periodi, così che sia favorita la ricostruzione di processi complicati e siano effettuate osservazioni importanti per la genesi delle patologie, incluse quelle che necessitano di un tempo di incubazione, quali i tumori.

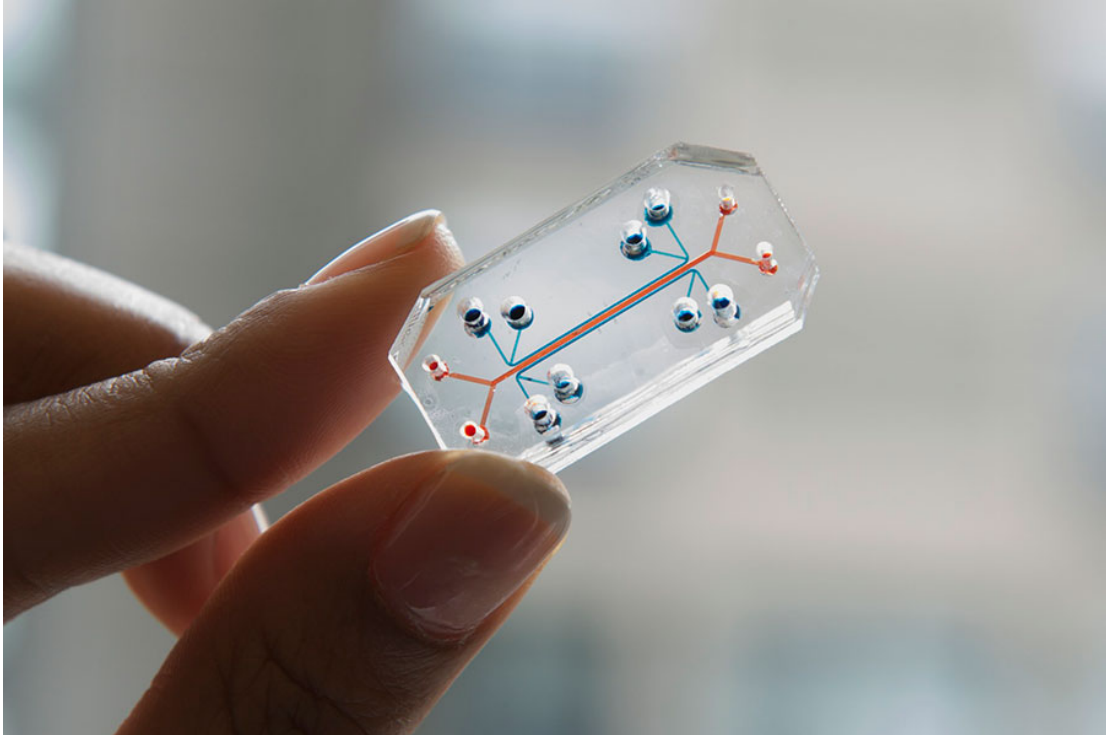


Figura 4: Modello accurato dei polmoni umani per testare la sicurezza e l'efficacia dei farmaci. (Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering, foto dell'Università di Harvard).

Un'applicazione della tecnica sperimentale OOC riguarda proprio lo studio del cancro ("*Cancer-on-chip (COC)*"), nei suoi vari stadi: crescita, invasione, angiogenesi e step successivi talvolta di difficile trattazione (metastasi). Il vantaggio di tale sperimentazione risiede nel poter trattare componenti molecolari, cellulari e tissutali separatamente o in combinazione tra loro, così da poter analizzare la fisiologia del cancro umano.

L'analisi avanzata in questo lavoro si basa su uno studio di Vacchelli et al. [7], nel quale il focus è posto sulla riproduzione dell'interazione tra cellule immunitarie e cellule tumorali, al fine di valutare come il cancro risponde a terapie in presenza di un sistema immunitario sano.

L'immunoterapia è una delle tecniche più efficienti per il contrasto delle cellule tumorali, in particolare le cellule T che costituiscono il sistema immunitario mirano le cellule tumorale per poi distruggerle.

Questa operazione può essere avviata mediante terapie farmacologiche (tramite le citochine), virus oncolitici e vaccini.

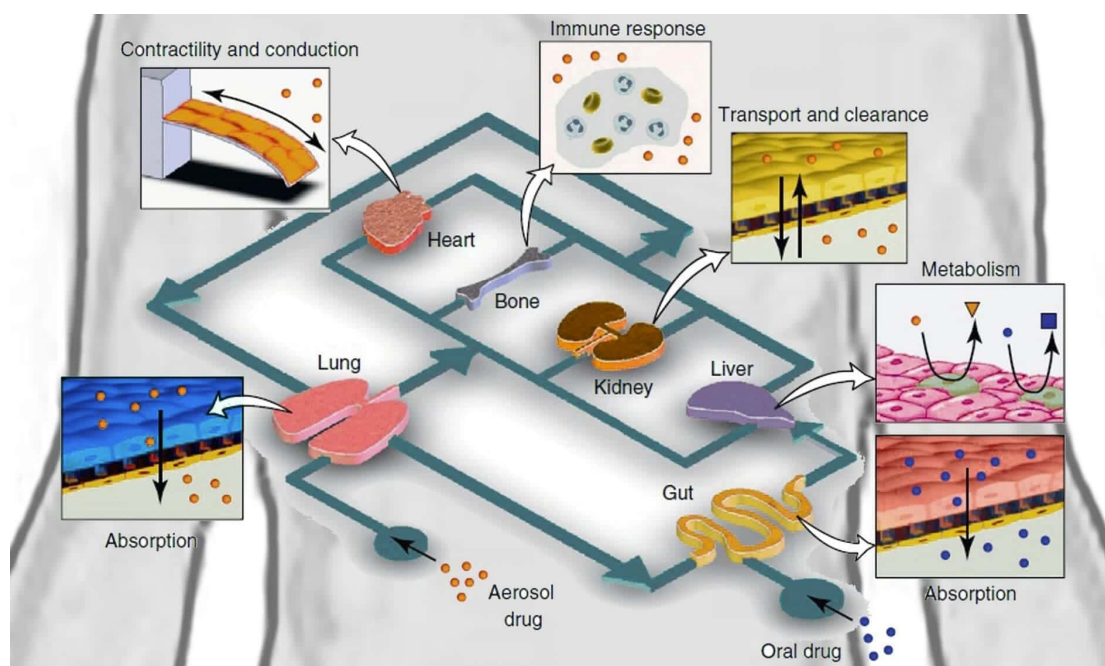


Figura 5: Ricostruzione di un "Human Body-on-chip" per simulare l'interazione tra diversi organi.

Questo approccio ha favorito in molti casi il prolungamento della vita per pazienti affetti da cancro, ma il tasso di fallimento dei farmaci adoperati è circa il doppio rispetto ai farmaci non oncologici, per cui buona parte delle terapie proposte non raggiungono l'approvazione finale [10].

L'introduzione artificiale del carcinoma negli animali non rispecchia l'attività cellulare umana: in molti casi il cancro è associato all'invecchiamento umano, ma questo aspetto non è riprodotto dai modelli murini.

In aggiunta, il ruolo di contrasto allo sviluppo del cancro, come è noto, è affidato alle cellule T del comparto immunitario. Nei topi, principali animali adibiti alle sperimentazioni terapeutiche *in vitro*, le medesime cellule non svolgono il compito richiesto.

Affinché le differenze riscontrate siano risanate, i ricercatori hanno sviluppato modelli 3D sulla base di sperimentazioni *in vitro*. Idealmente, gli esperimenti devono essere in grado di rigenerare le osservazioni biologiche, dunque è necessaria la presenza di un tessuto tumorale posto all'interno di un micro-ambiente tumorale. Nell'insieme il cancro deve vascolarizzare, al fine di alimentare le cellule mediante ossigeno e nutrienti, ed interagire con le componenti immunitarie, in quanto lo sviluppo del tumore è associato al mancato intervento del sistema immunitario.

La tecnologia micro-fluidica consente l'isolamento di cellule tumorali e la loro interazione con il sistema immunitario e si basa sulla variazione di gradienti di concentrazione di citochine/chemochine.

La composizione degli ambienti sperimentali consente di progettare micro-ambienti adatti allo studio che si vuole effettuare, a seconda della ricerca richiesta.

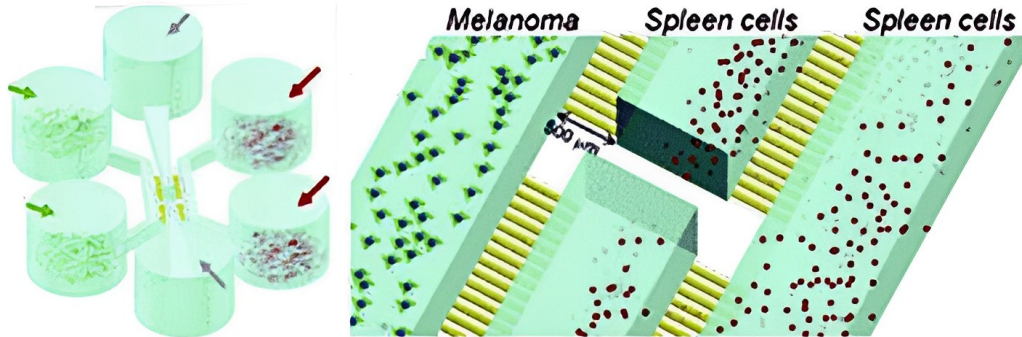


Figura 6: Esempio di chip micro-fluidico per l'interazione tra cellule tumorali e cellule immunitarie: a sinistra il chip adoperato nelle sperimentazioni; a destra la semplificazione del chip introdotta per effettuare le simulazioni numeriche, costituita da due camere di coltura principali (popolazioni tumorali e immunitarie) collegate da micro-canali [10].

In realtà, il lavoro citato [7] estende la trattazione anche al caso in cui il sistema immunitario presenti dei deficit, analizzando come questi possano compromettere il suo operato: le cellule sono portatrici di varianti del gene che codifica il recettore FPR1 (*"Formyl Peptide Receptor 1"*), deputato al riconoscimento del tumore stesso. Sperimentalmente si è osservato come in presenza di questa deformazione, le cellule immunitarie non riescono ad agire in presenza di un particolare trattamento chemioterapico, impedendone la loro attività nei confronti delle cellule tumorali (Fig. 7).

In presenza di un tessuto completamente sano, le traiettorie descritte dalle cellule immunitarie durante il moto migratorio sono guidate dai gradienti delle sostanze chimiche prodotte: si osserva infatti come, la produzione delle chemochine da parte della componente benigna individui gli aggregati tumorali e consenta la migrazione verso di essi, così da poterne contrastare lo sviluppo [11].

Le cellule tumorali introdotte nel chip possono subire un trattamento chemioterapico, sin dagli inizi, in maniera tale da indurre le cellule immunitarie ad agire esclusivamente sulle componenti tumorali e non sulle loro controparti sane, svolgendo il ruolo di immunosorveglianza.

Il chip sperimentalmente utilizzato per la trattazione della risposta tumorale è costituito da tre camere di coltura principali per le cellule tumorali collegate tramite micro-capillari a cellule immunitarie, così da favorire il contatto chimico tra le due specie cellulari.

I filmati registrati per la rappresentazione degli esperimenti mostrano due camere principali, a sinistra sono concentrate le cellule tumorali, a destra quelle immunitarie, di dimensioni $1\text{mm} \times 100\mu\text{m}$, collegate da micro-canali di dimensioni $12\mu\text{m} \times 500\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. In realtà, la terza dimensione è trascurata, in quanto gli esperimenti sono condotti in $2D$, mantenendo invariata l'altezza.

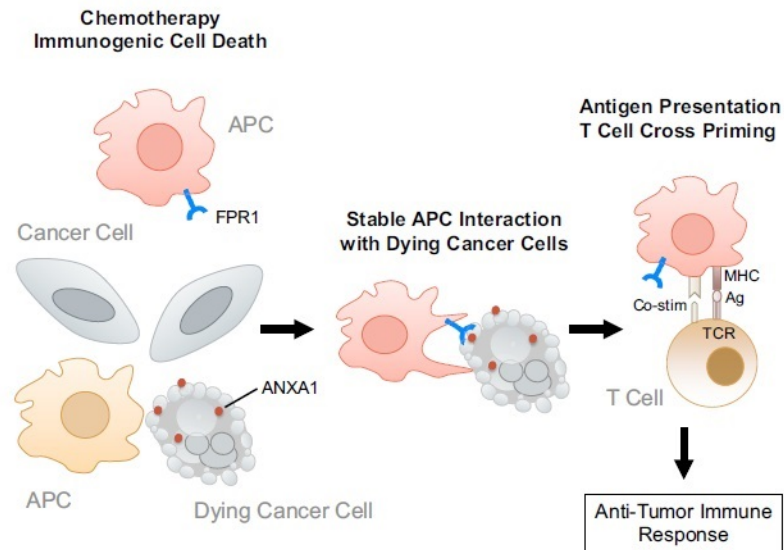


Figura 7: Il recettore FPR1 favorisce l'interazione tra i macrofagi e le cellule tumorali morenti, in seguito al trattamento chemioterapico. Ciò consente un'attività immunitaria antitumorale, stimolando i linfociti T [16].

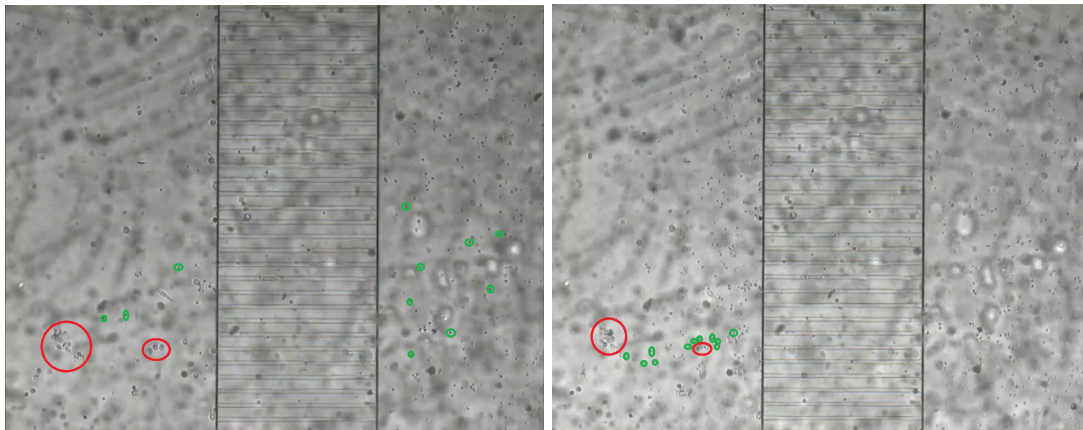


Figura 8: Timelapse dell'esperimento di Vacchelli et al. [10] dopo 24 ore per cellule tumorali precedentemente trattate da farmaco chemioterapico. A sinistra: situazione iniziale nella quale le cellule immunitarie (verdi) e gli aggregati tumorali (rossi) non hanno interagito. A destra: le cellule immunitarie migrano verso gli aggregati tumorali e li circondano.

Il cancro sperimentalmente introdotto nella camera è rappresentato da cellule di carcinoma mammario umano, che possono essere precedentemente trattate con chemioterapia a base di antracicline, mentre il comparto immunitario è identificato da cellule mononucleari del sangue periferico umano.

Il terreno di coltura del chip è neutro, dunque nel sistema non viene introdotta alcuna

sostanza esogena.

I filmati sono stati registrati da un microscopio posizionato all'interno dell'incubatore a CO_2 per un periodo di 72 ore.

Quando nella camera di coltura tumorale è introdotto un farmaco chemioterapico, durante gli esperimenti si osserva una migrazione delle cellule immunitarie, guidata dal rilevamento di fattori chimici prodotti dalle cellule tumorali stesse (**Fig. 9**). In questo modo, le cellule immunitarie raggiungono la controparte maligna e ne causano la morte.

Scenario opposto si manifesta quando le cellule tumorali non sono precedentemente trattate: l'attività di proliferazione cellulare maligna sovrasta l'operato delle cellule immunitarie, consentendo una incessante propagazione della patologia. Gli aggregati tumorali non rilasciano la sostanza chemioattraente, ciò implica un mancato riconoscimento da parte delle cellule immunitarie, che rimangono confinate nella porzione di spazio, dove sono inizialmente concentrate (Vedi **Fig. 10**).

Le simulazioni numeriche, riportate di seguito, presentano l'obiettivo di riprodurre questi

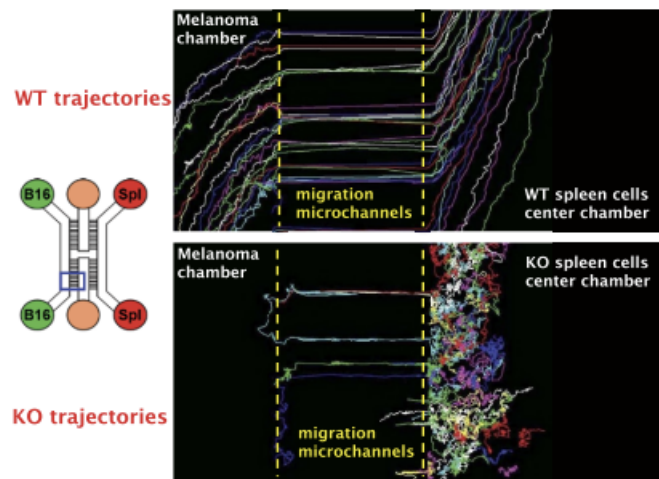


Figura 9: In alto, l'immagine rappresenta le traiettorie percorse dai geni "wild type", ovvero fenotipi naturali. In basso, la figura mostra il percorso descritto dai geni "knockout" (mutati). [17]

due importanti aspetti dello sviluppo tumorale.

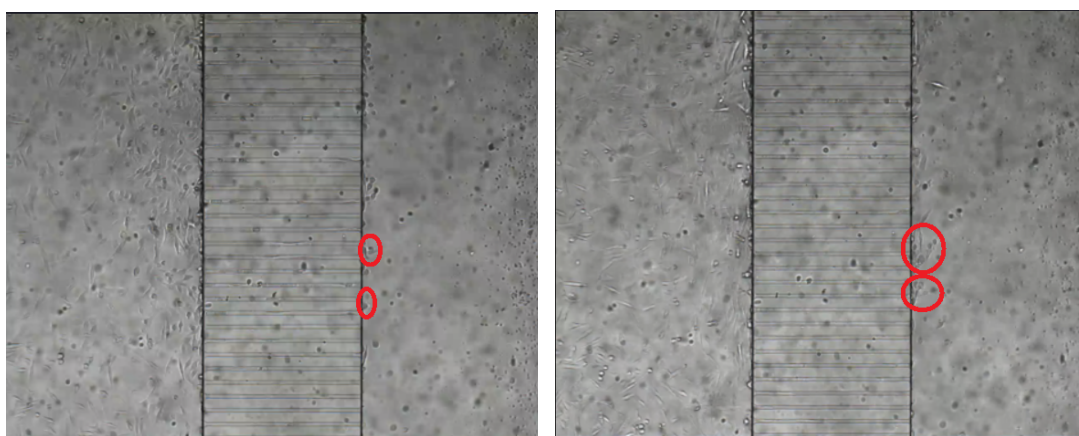


Figura 10: *Timelapse dell'esperimento di Vacchelli et al. [10] dopo 24 ore per cellule tumorali non trattate. A sinistra: situazione iniziale nella quale poche cellule tumorali (rosse) sono presenti nella coltura immunitaria. A destra: gli aggregati tumorali stanno invadendo la camera destra; le cellule immunitarie non riconoscono l'antigene e rimangono confinate nella porzione di camera nella quale sono inizialmente concentrate.*

2. Modello matematico

La formulazione di un modello matematico per simulare quanto più verosimilmente possibile il comportamento di alcune cellule biologiche negli ambienti di sviluppo è un processo molto complesso. Proprio in seguito a ciò, risulta necessario applicare delle semplificazioni:

1. la terza dimensione che costituisce il dominio di sperimentazione è trascurata, in quanto non sono disponibili delle misurazioni di laboratorio che considerano l'evoluzione lungo la verticale del processo;
2. le cellule immunitarie non proliferano.

Tutto il processo biologico è gestito dalle sostanze prodotte da parte delle cellule coinvolte, ovvero l'ambiente esterno non presenta elementi esogeni.

Il dominio implementato è costituito da due camere, collegate da micro-canali, al cui interno sono introdotte due macro popolazioni: cellule tumorali e cellule immunitarie. Dunque, l'intera geometria può essere semplificata adoperando modelli bidimensionali. In particolare, il modello implementato per descrivere l'interazione tra le cellule si ispira a quello proposto da *Keller-Segel*, presentato di seguito:

$$\begin{cases} \frac{\partial T}{\partial t} &= D_T \Delta T - \lambda_T(\omega)T + k_T T \\ \frac{\partial M}{\partial t} &= D_M \Delta M - \nabla \cdot (\chi(\varphi)M \nabla \varphi) \\ \frac{\partial \varphi}{\partial t} &= D_\varphi \Delta \varphi + \alpha_\varphi T - \beta_\varphi \varphi \\ \frac{\partial \omega}{\partial t} &= D_\omega \Delta \omega + \alpha_\omega M - \beta_\omega \omega \end{cases} \quad (1)$$

Si tratta di un sistema di equazioni di diffusione e reazione nel quale le cellule tumorali T producono segnali chimici φ con lo scopo di attrarre le cellule immunitarie M , che avviano un processo di migrazione verso esse. Queste ultime secernono a loro volta un'altra componente chimica ω , la citotossina, con il ruolo di provocare la morte delle cellule maligne; per questo motivo, nella equazione tumorale, alla diffusione è sottratto il termine $\lambda_T(\omega)T$, dove

$$\lambda_T(\omega) = \frac{S\omega}{\gamma + \omega}$$

con S tasso massimo di secrezione della citotossina da parte delle cellule immunitarie e γ costante associata alla produzione.

A differenza delle cellule immunitarie, si suppone che le cellule tumorali siano in grado di proliferare all'interno del dominio, infatti nel modello è stato introdotto un termine del tipo $k_T T$, con k_T tasso di proliferazione.

La seconda equazione del sistema (1) è costituita da una componente diffusiva e un termine chemiotattico $f = \chi(\varphi)\nabla\varphi$ dovuto all'azione di φ .

Riuscire a stabilire una definizione unica per la sensibilità chemiotattica $\chi(\varphi)$ è un procedimento molto complicato, in quanto si auspica che il modello generi risultati quanto

più simili alle sperimentazioni effettuate. La forma proposta da Lapidis e Schiller risulta essere la seguente [8]:

$$\chi(\varphi) = \frac{k_1}{(k_2 + \varphi)^2} \quad (2)$$

dove k_1 rappresenta la velocità di deriva cellulare, mentre k_2 è la costante di dissociazione del recettore ed indica la quantità di molecole necessarie affinché il recettore formi dei legami. Per completezza, il presente studio è stato effettuato implementando differenti definizioni della sensitività chemiotattica, con lo scopo di avvalorare la formulazione (2). Le espressioni che coinvolgono le sostanze chimiche φ e ω sono le medesime e composte dalle seguenti proprietà:

- diffusione data dai coefficienti D_φ e D_ω ;
- produzione da parte delle cellule tumorali, gestita dal termine α_φ , e delle cellule immunitarie, governata dal coefficiente α_ω ;
- consumo guidato dai tassi β_φ e β_ω .

A questo punto della trattazione, l'articolo di riferimento [1] presenta due scelte di modelli differenti implementati per i canali: dapprima la versione $1D$ del modello di *Keller-Segel* per valutare il caso monodimensionale, in seguito un modello parabolico-iperbolico con velocità finita di propagazione delle cellule. Nelle simulazioni effettuate, si è scelto di imporre nei canali il medesimo sistema applicato nelle camere, avendo trattato l'intero dominio come bidimensionale e non come combinazione di $2D$ e $1D$.

2.1. Analisi qualitativa del modello matematico

Il modello adoperato per simulare l'interazione tra le cellule tumorali e quelle immunitarie risulta particolarmente complesso, a causa della dipendenza di ogni equazione dalle altre variabili e della presenza di un termine volto a modellizzare la *chemotaxis*.

Per questo motivo si introduce un'analisi qualitativa, per poter valutare alcuni comportamenti teoricamente attesi, apportando alcune determinanti semplificazioni.

In primo luogo, sarà analizzato il comportamento asintotico del modello e successivamente sarà valutata la stabilità del sistema nei punti di equilibrio.

2.1.1 Comportamento asintotico

Il modello completo implementato nelle simulazioni si presenta nel seguente modo:

$$\begin{cases} \frac{\partial T}{\partial t} &= D_T \Delta T - \lambda_T(\omega)T + k_T T \\ \frac{\partial M}{\partial t} &= D_M \Delta M - \nabla \cdot (\chi(\varphi)M \nabla \varphi) \\ \frac{\partial \varphi}{\partial t} &= D_\varphi \Delta \varphi + \alpha_\varphi T - \beta_\varphi \varphi \\ \frac{\partial \omega}{\partial t} &= D_\omega \Delta \omega + \alpha_\omega M - \beta_\omega \omega \end{cases}$$

Dunque la struttura risulta particolarmente complessa, affinché possa essere effettuata un'analisi sul comportamento asintotico che coinvolga l'intero modello, per cui sono state attuate le seguenti semplificazioni:

- il dominio giace in uno spazio unidimensionale, piuttosto che bidimensionale;
- le variabili sono costanti in tempo (caso stazionario);
- la variabile ω è trascurata, in quanto non rilevata sperimentalmente.

Con queste semplificazioni, si ottiene il seguente modello:

$$\begin{cases} D_T \frac{d^2 T}{dx^2} + k_T T &= 0 \\ D_M \frac{d^2 M}{dx^2} - \frac{d}{dx} (\chi(\varphi)M \frac{d\varphi}{dx}) &= 0 \\ D_\varphi \frac{d^2 \varphi}{dx^2} + \alpha_\varphi T - \beta_\varphi \varphi &= 0 \end{cases}$$

Poiché il focus dell'intera ricerca si basa sull'analisi delle cellule immunitarie in relazione alla presenza di aggregati tumorali, è naturale la scelta di trascurare l'equazione introdotta per simulare il comportamento della concentrazione di cellule maligne.

Tale scelta consente di porre l'attenzione sul processo di *chemotaxis* e dunque sul rapporto che intercorre tra i macrofagi e la sostanza chimica φ . In particolare, lo scopo è quello di

comprendere la distribuzione assunta dalle cellule immunitarie per tempi lunghi. Il sistema si riduce a due equazioni, legate tra loro:

$$\begin{cases} D_M \frac{d^2 M}{dx^2} - \frac{d}{dx}(\chi(\varphi)M \frac{d\varphi}{dx}) = 0 \\ D_\varphi \frac{d^2 \varphi}{dx^2} + \alpha_\varphi T(x) - \beta_\varphi \varphi = 0 \end{cases} \quad (3)$$

con $T(x)$ nota.

Poiché l'equazione per la sostanza chimica prodotta dalle cellule tumorali è indipendente dalla concentrazione di macrofagi, è possibile valutare il comportamento di φ sin da subito. Si noti che nell'espressione contenente l'evoluzione della sostanza chimica, è presente una dipendenza dalla concentrazione di aggregati tumorali.

Affinché sia possibile ricavare una distribuzione esplicita di φ in funzione della coordinata spaziale x , si distinguono due casi per l'espressione di T :

1. $T = T_0$ con T_0 costante opportunamente scelta;
2. $T = T(x)$ con $T(x)$ particolare funzione di x , presentata in seguito.

Caso 1: $T = T_0$ costante

Sotto l'ipotesi che la concentrazione delle cellule tumorali assuma una distribuzione costante in spazio, l'equazione contenente la variabile φ assume la seguente forma:

$$D_\varphi \frac{d^2 \varphi}{dx^2} + \alpha_\varphi T_0 - \beta_\varphi \varphi = 0$$

ovvero

$$D_\varphi \frac{d^2 \varphi}{dx^2} - \beta_\varphi \varphi = -\alpha_\varphi T_0. \quad (4)$$

L'equazione differenziale ottenuta è non omogenea di secondo ordine con unica variabile φ , per cui è possibile calcolare la soluzione esplicita.

In primo luogo, è necessario calcolare la soluzione dell'equazione omogenea di secondo ordine associata:

$$D_\varphi \frac{d^2 \varphi}{dx^2} - \beta_\varphi \varphi = 0.$$

Il polinomio caratteristico ad essa associato è

$$\lambda^2 - \frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} = 0$$

le cui soluzioni sono due radici reali distinte

$$\lambda_1 = -\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}}$$

$$\lambda_2 = \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}}.$$

Dunque, la soluzione dell'omogenea associata è pari a

$$\varphi_{omo}(x) = c_1 e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}}x} + c_2 e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}}x} \quad (5)$$

con c_1 e c_2 costanti.

Noto ciò, la distribuzione della sostanza chimica è data dalla somma della soluzione appena trovata e della soluzione particolare associata a (4).

Quest'ultima è ottenuta mediante il metodo di somiglianza, nel quale si suppone che la soluzione particolare assuma la stessa forma del termine noto dell'equazione, dunque

$$\varphi_{part}(x) = A \quad (6)$$

con A costante, poiché il termine noto dell'equazione (4) è anch'esso costante.

Essendo (6) una soluzione particolare dell'equazione (4), essa verifica tale uguaglianza, per cui è possibile ricavare l'espressione di A :

$$-\beta_\varphi A = -\alpha_\varphi T_0$$

da cui

$$A = \frac{\alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi}.$$

La distribuzione di φ assume la seguente forma:

$$\varphi(x) = c_1 e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}}x} + c_2 e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}}x} + \frac{\alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi}.$$

Per poter ricavare le costanti c_1 e c_2 è necessario applicare delle condizioni al bordo, considerando $x \in [0, L]$, dove L è la lunghezza del dominio.

In questo particolare caso di distribuzione costante delle cellule tumorali, si è scelto di adoperare delle condizioni al contorno di *Kedem-Katchalsky*:

$$\begin{cases} D_\varphi \frac{d\varphi}{dx}(0) = -\epsilon\varphi(0) \\ D_\varphi \frac{d\varphi}{dx}(L) = -\epsilon\varphi(L) \end{cases} \quad (7)$$

In prima battuta, è necessario calcolare la derivata prima della variabile φ in spazio

$$\frac{d\varphi}{dx}(x) = -c_1 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}}x} + c_2 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}}x}$$

e valutarla in 0 e L :

$$\frac{d\varphi}{dx}(0) = -c_1 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} + c_2 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}}$$

$$\frac{d\varphi}{dx}(L) = -c_1 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + c_2 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L}.$$

Inoltre

$$\varphi(0) = c_1 + c_2 + \frac{\alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi}$$

$$\varphi(L) = c_1 e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + c_2 e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + \frac{\alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi}.$$

Per cui, le condizioni al bordo presentante in (7), conducono al seguente sistema:

$$\begin{cases} D_\varphi \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} (-c_1 + c_2) & = -\epsilon \left(c_1 + c_2 + \frac{\alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi} \right) \\ D_\varphi \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} \left(-c_1 e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + c_2 e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) & = -\epsilon \left(c_1 e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + c_2 e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + \frac{\alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi} \right) \end{cases}$$

Di conseguenza, adoperando il metodo della sostituzione, le costanti assumono i seguenti valori:

$$\begin{cases} c_1 = \frac{\epsilon^2 \alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi (\epsilon^2 - D_\varphi \beta_\varphi)} \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} - 1 \right) \\ c_2 = \frac{\epsilon \alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi (\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} + \epsilon)} \left[\frac{\epsilon \left(1 - e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right)}{(\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} + \epsilon) \left(e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} - e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right)} - 1 \right] \end{cases} \quad (8)$$

In definitiva

$$\begin{aligned}
\varphi(x) = & \frac{\epsilon^2 \alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi (\epsilon^2 - D_\varphi \beta_\varphi)} \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} L} - 1} e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} x} + \right. \\
& \left. e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} L} - e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} L}} \right) \\
& + \frac{\epsilon \alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi (\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} + \epsilon)} \left[\frac{\epsilon \left(1 - e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} L} \right)}{\left(\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} + \epsilon \right) \left(e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} L} - e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} L}} \right)} - 1 \right] e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} x} + \\
& + \frac{\alpha_\varphi T_0}{\beta_\varphi}.
\end{aligned} \tag{9}$$

Nota l'espressione di $\varphi(x)$, è possibile calcolare la distribuzione spaziale di M per tempi lunghi.

Dalla prima equazione del sistema (3), si ricava una soluzione per una generica $\varphi(x)$.

Integrando l'equazione

$$D_M \frac{d^2 M}{dx^2} - \frac{d}{dx} \left(\chi(\varphi) M \frac{d\varphi}{dx} \right) = 0$$

si ottiene

$$D_M \frac{dM}{dx} - \chi(\varphi) M \frac{d\varphi}{dx} = \text{costante}. \tag{10}$$

Imponendo la condizione di flusso nullo al bordo per la concentrazione di cellule immunitarie, il valore della costante è pari a 0.

Sia

$$\Theta(\varphi) = \int \chi(\varphi) d\varphi$$

per cui

$$\frac{d\Theta}{d\varphi} = \chi(\varphi).$$

Dividendo l'equazione (10) per M e considerando che

$$\frac{d}{dx} \ln M = \frac{1}{M} \frac{dM}{dx}$$

si ricava

$$D_M \frac{d}{dx} \ln M - \frac{d\Theta}{d\varphi} \frac{d\varphi}{dx} = 0$$

ovvero

$$D_M \frac{d}{dx} \ln M = \frac{d\Theta}{dx}.$$

Integrando nuovamente l'espressione ottenuta, si deduce la seguente uguaglianza

$$\ln M = \frac{1}{D_M} \Theta(\varphi) + \tilde{c}.$$

Da cui

$$M = \tilde{C} e^{\frac{1}{D_M} \Theta(\varphi)}$$

con \tilde{C} costante.

Dunque, asintoticamente la concentrazione delle cellule immunitarie è una funzione esponenziale, dipendente dal valore di $\chi(\varphi)$.

Per semplicità, si supponga

$$\chi(\varphi) = k_1$$

con k_1 costante riportata nella **Tab. 1**.

Di conseguenza

$$M(x) = \tilde{C} e^{\frac{1}{D_M} k_1 \varphi(x)}. \quad (11)$$

Per poter ricavare il valore della costante \tilde{C} , si impone una condizione di Dirichlet sul bordo iniziale:

$$M(x=0) = 0.49. \quad (12)$$

La grandezza introdotta deriva dalla quantità continua asintoticamente ottenuta per M dalle simulazioni numeriche effettuate per $\chi(\varphi) = k_1$ e riportata in giallo in **Fig. 11**.

Con la condizione (12)

$$\begin{aligned}
\tilde{C} = 0.49 \exp \left\{ - \frac{k_1 \epsilon^2 \alpha_\varphi T_0}{D_M \beta_\varphi (\epsilon^2 - D_\varphi \beta_\varphi)} \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} L} - 1} \right) + \right. \\
- \frac{k_1 \epsilon \alpha_\varphi T_0}{D_M \beta_\varphi (\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} + \epsilon)} \left(\frac{\epsilon \left(1 - e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} L} \right)}{(\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} + \epsilon) \left(e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} L} - e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi} L}} \right)} - 1 \right) + \\
\left. - \frac{k_1 \alpha_\varphi T_0}{D_M \beta_\varphi} \right\}.
\end{aligned} \tag{13}$$

Per effettuare un confronto tra i risultati sperimentali ottenuti per la sensibilità chemo-tattica costante e quelli rivenuti teoricamente, è necessario calcolare i valori delle costanti c_1 , c_2 e \tilde{C} , note le loro espressioni esplicite e riportate in (8) e (13).

Nella **Tab. 1** sono riportati i parametri adoperati durante le simulazioni. Inoltre, si ipotizza che

- $\epsilon = 1 \frac{\mu m}{s}$;
- $T_0 = 1$.

Il dominio introdotto sperimentalmente si estende da $0 \mu m$ a $700 \mu m$, ma sfruttando la simmetria rispetto all'asse $x = 350$, le condizioni al bordo necessarie al modello possono essere definite per le $x \in [0 \mu m, 350 \mu m]$.

Dunque, è possibile calcolare il valore delle costanti:

$$\begin{cases} c_1 = -286.5 \\ c_2 = -222.54 \\ \tilde{C} = 0.492 \end{cases}$$

Da cui, sostituendo in (9) e (11),

$$\varphi(x) = -286.5 e^{-7 \times 10^{-4} x} - 222.54 e^{7 \times 10^{-4} x} + 500$$

e

$$M(x) = 0.492 e^{4.3 \times 10^{-4} (500 - 286.5 e^{-7 \times 10^{-4} x} - 222.54 e^{7 \times 10^{-4} x})}.$$

Parametri	Descrizione	Unità di misura	Valore
D_M	Diffusione di M	$\mu m^2 s^{-1}$	900
D_T	Diffusione di T	$\mu m^2 s^{-1}$	56
D_φ	Diffusione di φ	$\mu m^2 s^{-1}$	200
D_ω	Diffusione di ω	$\mu m^2 s^{-1}$	200
α_φ	tasso di produzione di φ	s^{-1}	0.5×10^{-1}
β_φ	tasso di consumo di φ	s^{-1}	10^{-4}
α_ω	tasso di produzione di ω	s^{-1}	10^{-1}
β_ω	tasso di consumo di ω	s^{-1}	10^{-4}
k_T	tasso di produzione di T	s^{-1}	0
k_1	velocità di deriva cellulare	$cm^2 s^{-1}$	3.9×10^{-9}
k_2	costante di dissociazione del recettore	–	5×10^{-6}
S	tasso massimo di secrezione delle sostanze chimiche	s^{-1}	1.9676×10^{-11}
γ	costante di produzione	–	10^{-4}
L_x	dimensione orizzontale della camera	μm	100
L_y	dimensione verticale della camera	μm	1000
L_{c_x}	dimensione orizzontale del canale	μm	500
L_{c_y}	dimensione verticale del canale	μm	12
δ	distanza tra due canali	μm	55

Tabella 1: *Tabella parametri*

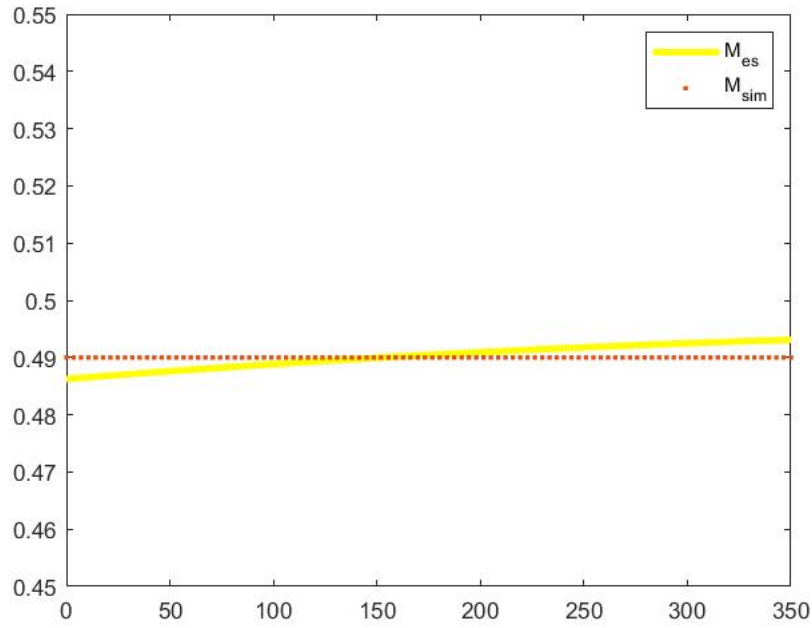


Figura 11: *Confronto tra la distribuzione delle cellule immunitarie ottenute teoricamente per $T = T_0$ (giallo) e sperimentalmente (rosso).*

Confrontando il risultato ottenuto teoricamente con la distribuzione rilevata dalle simulazioni (**Fig. 11**), avendo imposto la sensibilità chemiotattica costante (si rimanda al Paragrafo 3.1.1), si osserva una leggera discordanza: le cellule immunitarie teoricamente descrivono in una porzione del dominio una traiettoria rettilinea con una piccola pendenza positiva. Tale diversità è probabilmente dovuta alla scelta della condizione al bordo imposta sulla parte centrale del dominio, rispetto alla quale non è rinvenuto alcun dato sperimentale, e alle numerose semplificazioni effettuate sul modello affinché fosse possibile svolgerne una analisi; in relazione a ciò, di seguito si impone una differente espressione per gli aggregati tumorali.

Caso 2: $T = T(x)$

In questo ulteriore caso esemplificativo, si suppone di imporre la distribuzione della concentrazione delle cellule tumorali dipendente dalla grandezza spaziale.

In particolare

$$T(x) = T_0 e^{-\frac{x}{\lambda}}$$

dove λ è una costante.

Con tale scelta, l'equazione evolutiva della sostanza chimica φ nel sistema (3) assume la seguente forma:

$$D_\varphi \frac{d^2 \varphi}{dx^2} + \alpha_\varphi T_0 e^{-\frac{x}{\lambda}} - \beta_\varphi \varphi = 0. \quad (14)$$

Si tratta di una equazione del secondo ordine non omogenea che differisce dal precedente caso, in quanto possiede un termine noto spazialmente dipendente. Dunque la soluzione dell'equazione omogenea associata coincide con la trattazione già effettuata nel paragrafo antecedente e riportata in (5), ciò che si distingue è la soluzione particolare da sommare a quella nota.

Adoperando, come precedentemente fatto, il metodo di somiglianza, la soluzione particolare rispetta la seguente espressione:

$$\varphi_{part}(x) = B e^{-\frac{x}{\lambda}} \quad (15)$$

con B costante.

Il valore di B è rinvenuto dal calcolo delle derivate di $\varphi(x)$: essendo (15) una soluzione particolare, essa verifica l'equazione (14).

Dunque

$$\begin{aligned} \frac{d\varphi_{part}}{dx} &= -\frac{1}{\lambda} B e^{-\frac{x}{\lambda}} \\ \frac{d^2\varphi_{part}}{dx^2} &= \frac{1}{\lambda^2} B e^{-\frac{x}{\lambda}} \end{aligned}$$

per cui l'equazione (14) diviene

$$D_\varphi \frac{1}{\lambda^2} B e^{-\frac{x}{\lambda}} + \alpha_\varphi T_0 e^{-\frac{x}{\lambda}} - \beta_\varphi B e^{-\frac{x}{\lambda}} = 0.$$

Da ciò, si ottiene l'espressione per B :

$$B = -\frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda^2}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi}.$$

Segue la distribuzione della soluzione particolare per φ :

$$\varphi_{part}(x) = -\frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda^2}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi} e^{-\frac{x}{\lambda}}$$

da cui

$$\varphi(x) = c_3 e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} x} + c_4 e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} x} - \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda^2}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi} e^{-\frac{x}{\lambda}}.$$

Anche in questo caso c_3 e c_4 sono costanti, da identificare imponendo le condizioni al bordo sul dominio con $x \in [0, L]$.

In questo caso, si ipotizza di considerare condizioni al bordo della seguente tipologia:

$$\begin{cases} \frac{d\varphi}{dx}(x=0) & = 0 \\ D_\varphi \frac{d\varphi}{dx}(x=L) & = -\gamma\varphi(L) \end{cases} \quad (16)$$

con γ costante.

In primo luogo, è necessario calcolare la derivata spaziale della soluzione appena trovata

$$\frac{d\varphi}{dx}(x) = -c_3 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} x} + c_4 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} x} + \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi} e^{-\frac{x}{\lambda}}.$$

Dunque

$$\frac{d\varphi}{dx}(0) = -c_3 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} + c_4 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} + \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi}$$

$$\frac{d\varphi}{dx}(L) = -c_3 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + c_4 \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi} e^{-\frac{L}{\lambda}}$$

mentre

$$\varphi(L) = c_3 e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + c_4 e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} - \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda^2}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi} e^{-\frac{L}{\lambda}}.$$

Da cui, il sistema (16) assume la seguente forma:

$$\begin{cases} \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}}(c_4 - c_3) + \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi} = 0 \\ D_\varphi \left(\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} \left(-c_3 e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + c_4 e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) + \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi} e^{-\frac{L}{\lambda}} \right) = \\ = -\gamma \left(c_3 e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + c_4 e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} - \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda^2}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi} e^{-\frac{L}{\lambda}} \right) \end{cases}$$

Dunque, con il metodo di sostituzione, si ottiene

$$\begin{cases} c_3 = \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda \left[e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \left(\sqrt{\frac{D_\varphi}{\beta_\varphi}} \gamma + D_\varphi \right) + e^{-\frac{L}{\lambda}} (\gamma \lambda - D_\varphi) \right]}{(D_\varphi - \beta_\varphi \lambda^2) \left[\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} - e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) + \gamma \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) \right]} \\ c_4 = \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda \left[e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \left(\sqrt{\frac{D_\varphi}{\beta_\varphi}} \gamma + D_\varphi \right) + e^{-\frac{L}{\lambda}} (\gamma \lambda - D_\varphi) \right]}{(D_\varphi - \beta_\varphi \lambda^2) \left[\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} - e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) + \gamma \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) \right]} + \\ - \sqrt{\frac{D_\varphi}{\beta_\varphi}} \left(\frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda}{D_\varphi - \beta_\varphi \lambda^2} \right) \end{cases} \quad (17)$$

In definitiva

$$\begin{aligned}
\varphi(x) = & \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda \left[e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \left(\sqrt{\frac{D_\varphi}{\beta_\varphi}} \gamma + D_\varphi \right) + e^{-\frac{L}{\lambda}} (\gamma \lambda - D_\varphi) \right] e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} x}}{(D_\varphi - \beta_\varphi \lambda^2) \left[\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} - e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) + \gamma \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) \right]} + \\
& + \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda \left[e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \left(\sqrt{\frac{D_\varphi}{\beta_\varphi}} \gamma + D_\varphi \right) + e^{-\frac{L}{\lambda}} (\gamma \lambda - D_\varphi) \right] e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} x}}{(D_\varphi - \beta_\varphi \lambda^2) \left[\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} - e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) + \gamma \left(e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} + e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) \right]} + \\
& - \sqrt{\frac{D_\varphi}{\beta_\varphi}} \left(\frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda}{D_\varphi - \beta_\varphi \lambda^2} \right) e^{\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} x} - \frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda^2}{D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi} e^{-\frac{x}{\lambda}}.
\end{aligned} \tag{18}$$

Nota la distribuzione spaziale di $\varphi(x)$, è possibile rinvenire il comportamento asintotico delle cellule immunitarie, sostituendo l'espressione appena ricavata in (11), avendo supposto nuovamente il caso più semplice di sensibilità chemiotattica costante e condizione al bordo di flusso nullo. Rinominando la costante come \bar{C} , come nel caso precedente, dalle simulazioni si verifica la seguente condizione sul bordo sinistro del dominio:

$$M(x=0) = 0.49.$$

Da cui

$$\begin{aligned}
\bar{C} = 0.49 \exp \left\{ \frac{k_1}{D_M} \sqrt{\frac{D_\varphi}{\beta_\varphi}} \left(\frac{\alpha_\varphi T_0 \lambda}{D_\varphi - \beta_\varphi \lambda^2} \right) + \frac{k_1 \alpha_\varphi T_0 \lambda^2}{D_M (D_\varphi - \lambda^2 \beta_\varphi)} + \right. \\
\left. \frac{k_1 \alpha_\varphi T_0 \lambda \left[e \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L \left(\sqrt{\frac{D_\varphi}{\beta_\varphi}} \gamma + D_\varphi \right) + e^{-\frac{L}{\lambda}} (\gamma \lambda - D_\varphi) \right]}{D_M (D_\varphi - \beta_\varphi \lambda^2) \left[\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} \left(e \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L - e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) + \gamma \left(e \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L + e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) \right]} + \right. \\
\left. \frac{k_1 \alpha_\varphi T_0 \lambda \left[e \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L \left(\sqrt{\frac{D_\varphi}{\beta_\varphi}} \gamma + D_\varphi \right) + e^{-\frac{L}{\lambda}} (\gamma \lambda - D_\varphi) \right]}{D_M (D_\varphi - \beta_\varphi \lambda^2) \left[\sqrt{D_\varphi \beta_\varphi} \left(e \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L - e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) + \gamma \left(e \sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L + e^{-\sqrt{\frac{\beta_\varphi}{D_\varphi}} L} \right) \right]} \right\}. \tag{19}
\end{aligned}$$

Anche in questo caso, risulta necessario valutare l'affidabilità della soluzione teorica calcolata, paragonandola alla distribuzione continua ottenuta sperimentalmente. A tal fine, sostituendo i parametri presenti in **Tab. 1** in (17) e (19) e supponendo che

- $\gamma = 1 \frac{\mu m}{s}$;
- $T_0 = 1$;
- $\lambda = 10 \mu m$;
- $L = 350 \mu m$ (avendo sfruttato nuovamente la simmetria del dominio)

si ottiene

$$\begin{cases} c_3 = 2.42 \\ c_4 = -1.11 \\ \bar{C} = 0.49 \end{cases}$$

Dunque da (18) e (11)

$$\varphi(x) = 2.42 e^{-7 \times 10^{-4} x} - 1.11 e^{7 \times 10^{-4} x} - 2.5 \times 10^{-2} e^{-\frac{x}{10}}$$

e

$$M(x) = 0.49e^{4.3 \times 10^{-4} \left(2.42e^{-7 \times 10^{-4}x} - 1.11e^{7 \times 10^{-4}x} - 0.025e^{-\frac{x}{10}} \right)}.$$

Rappresentando graficamente l'espressione dei macrofagi ottenuta teoricamente si osserva, a differenza del caso precedente, un completo accordo con gli esperimenti effettuati numericamente: una distribuzione continua nello spazio per tempi lunghi (Vedi **Fig. 12**). Probabilmente la scelta di una funzione spazialmente dipendente per l'evoluzione degli aggregati tumorali, risulta più idonea alle sperimentazioni e alle condizioni al bordo imposte.

Dunque, le cellule immunitarie, in presenza di sostanze secrete dalle cellule tumorali, tendono ad occupare tutto lo spazio a loro disposizione, così da contrastare l'attività maligna (come mostrato in seguito in **Fig. 16**), imponendo un'attività chemiotattica costante. Ciò si suppone sia dovuto al rapporto che intercorre tra la lunghezza effettiva del dominio e la "diffusion length", ovvero la lunghezza oltre la quale il fattore chemiotattico è completamente degradato. Dalla seconda equazione del sistema (3), trascurando il secondo termine, il valore di questa lunghezza caratteristica è pari a

$$\sqrt{\frac{D_\varphi}{\beta_\varphi}} = 1414.21 \mu m.$$

Per cui, l'intero dominio implica un avvicinamento all'esaurimento totale della sostanza chimica e dunque una scarsa presenza di aggregati tumorali, a seguito dell'attività immunitaria.

2.1.2. Stabilità del modello

Effettuare un'analisi sulla stabilità dell'intero modello presentato in precedenza (1) coinvolge le stesse problematiche già introdotte per il comportamento asintotico. Dunque anche in questo caso si effettuano delle ipotesi sul modello, affinché si ottenga un sistema di equazioni per il quale è possibile avanzare una discussione riguardo una eventuale stabilità dei punti di equilibrio individuati.

Sulla base di uno studio proposto da *Wang et. al* [15], è possibile attuare una analisi qualitativa della stabilità del modello di *Keller-Segel*, considerando esclusivamente il rapporto tra le cellule immunitarie e la secrezione della sostanza chemiotattica.

Nell'articolo di riferimento il modello si presenta, riadattando i coefficienti e le variabili in gioco al caso in analisi, nel seguente modo:

$$\begin{cases} \frac{\partial M}{\partial t} &= \nabla \cdot (D_M \nabla M - \chi(\varphi) M \nabla \varphi) \\ \frac{\partial \varphi}{\partial t} &= D_\varphi \Delta \varphi + \left(\frac{\alpha_\varphi}{\zeta} - \beta_\varphi \right) \varphi \end{cases} \quad (20)$$

Per ottenere la seconda equazione a partire dal modello (1), indipendente dalla distribuzione di T , si suppone, per semplicità che

$$\varphi = \zeta T$$

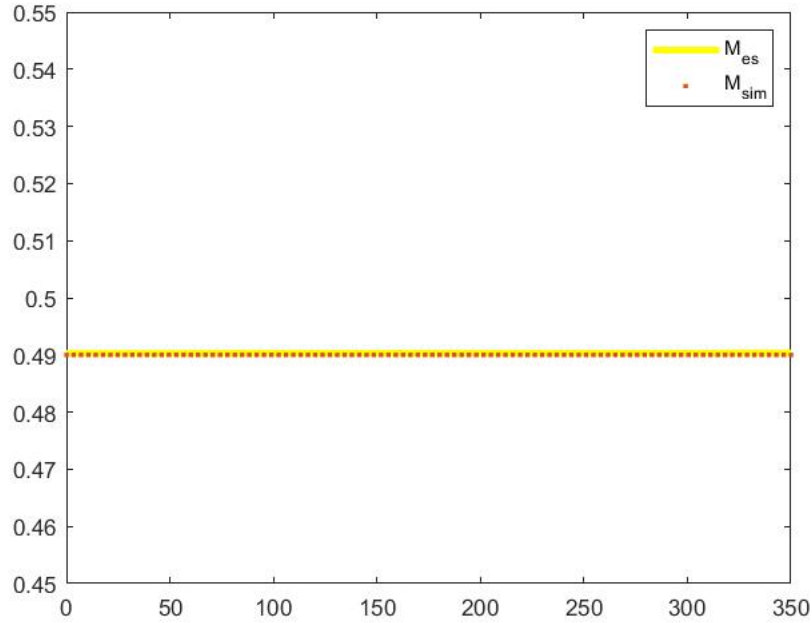


Figura 12: Confronto tra la distribuzione delle cellule immunitarie ottenute teoricamente per $T = T(x)$ (giallo) e sperimentalmente (rosso).

ovvero, la sostanza chimica si distribuisce come le cellule tumorali a meno di una costante ζ diversa da 0.

Sostituendo tale espressione nell'equazione evolutiva di φ in (1), si ottiene l'espressione presente nel sistema (20).

Le condizioni al bordo associate al modello si presentano come delle *no flux* e le concentrazioni iniziali delle quantità coinvolte sono positive (in accordo con le simulazioni numeriche effettuate).

Considerando la soluzione omogenea indipendente dal tempo, dalla seconda equazione del sistema (20)

$$\varphi^* = 0;$$

sostituendo ciò nella distribuzione omogenea per le cellule immunitarie, $m = costante$, per cui punti di equilibrio del sistema sono della forma:

$$(m, 0)$$

con m costante.

Proseguendo con l'analisi della stabilità, si suppone di perturbare il sistema nel seguente modo:

$$M = m + \tilde{M}$$

$$\varphi = \tilde{\varphi}$$

dove $(m,0)$ sono punti di equilibrio del sistema e $(\tilde{M}, \tilde{\varphi})$ sono piccole perturbazioni applicate al modello.

Dunque, il sistema (20) diventa

$$\begin{cases} \frac{\partial \tilde{M}}{\partial t} \approx \nabla \cdot (D_M \nabla \tilde{M} - \chi(0)m \nabla \tilde{\varphi}) \\ \frac{\partial \tilde{\varphi}}{\partial t} \approx D_\varphi \Delta \tilde{\varphi} + \left(\frac{\alpha_\varphi}{\zeta} - \beta_\varphi \right) \tilde{\varphi} \end{cases}$$

Applicando la teoria della stabilità linearizzata, è necessario valutare il segno degli autovalori della seguente matrice:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} -D_M \Lambda^2 & \chi(0)m \Lambda^2 \\ 0 & -D_\varphi \Lambda^2 + \frac{\alpha_\varphi}{\zeta} - \beta_\varphi \end{bmatrix}$$

con $\Lambda = \Lambda_k$ per $k = 1, 2, \dots$ autovalori dell'operatore $-\Delta$ con condizioni al bordo di Neumann applicate al dominio.

Nel caso particolare in cui il dominio è unidimensionale, ovvero $x \in [0, L]$, allora $\Lambda_k = \frac{k\pi}{L}$.

Dunque

$$\mathbf{A}_k = \begin{bmatrix} -D_M \left(\frac{k\pi}{L} \right)^2 & \chi(0)m \left(\frac{k\pi}{L} \right)^2 \\ 0 & -D_\varphi \left(\frac{k\pi}{L} \right)^2 + \frac{\alpha_\varphi}{\zeta} - \beta_\varphi \end{bmatrix}.$$

Il punto di equilibrio $(m,0)$ è stabile se la matrice \mathbf{A}_k ammette autovalori con parte reale negativa.

Per il modello in analisi, la matrice \mathbf{A}_k è triangolare superiore, dunque gli autovalori sono gli elementi presenti sulla diagonale:

$$\lambda_1 = -D_M \left(\frac{k\pi}{L} \right)^2$$

$$\lambda_2 = -D_\varphi \left(\frac{k\pi}{L} \right)^2 + \frac{\alpha_\varphi}{\zeta} - \beta_\varphi.$$

Dunque si osserva che il primo autovalore ha parte reale negativa, mentre il secondo autovalore, non ha un segno definito a priori; λ_2 ha parte reale negativa se

$$\zeta > \frac{\alpha_\varphi}{D_\varphi \left(\frac{k\pi}{L} \right)^2 + \beta_\varphi}.$$

Sotto queste ipotesi, entrambi gli autovalori hanno parte reale negativa, per cui i punti di equilibrio individuati $(m,0)$ risultano localmente asintoticamente stabili.

L'articolo di riferimento [15] mostra un caso più complesso, nel quale l'equazione della sostanza chemoattraente presente in (20) include anche un termine di dipendenza dalla variabile che risente l'attività attrattiva svolta dalla sostanza stessa, dunque l'espressione completa per φ sarebbe

$$\frac{\partial \varphi}{\partial t} = D_\varphi \Delta \varphi + \left(\frac{\alpha_\varphi}{\zeta} - \beta_\varphi \right) \varphi + h(M)$$

con $h(M)$ funzione di M .

In questo caso, i punti di equilibrio del sistema sarebbero i seguenti:

- $(0,0)$;
- $(m, h(m))$ con m costante.

ed il sistema perturbato assumerebbe la seguente forma:

$$\begin{cases} \frac{\partial \tilde{M}}{\partial t} \approx \nabla \cdot (D_M \nabla \tilde{M} - \chi(\varphi_0) m \nabla \tilde{\varphi}) \\ \frac{\partial \tilde{\varphi}}{\partial t} \approx D_\varphi \Delta \tilde{\varphi} + \left(\frac{\alpha_\varphi}{\zeta} - \beta_\varphi \right) \tilde{\varphi} + h'(m) \tilde{M} \end{cases}$$

dove (m, φ_0) sono generici punti di equilibrio del modello.

Con l'introduzione della dipendenza dalla concentrazione delle cellule immunitarie, la matrice \mathbf{A}_k è piena:

$$\mathbf{A}_k = \begin{bmatrix} -D_M \left(\frac{k\pi}{L} \right)^2 & \chi(\varphi_0) m \left(\frac{k\pi}{L} \right)^2 \\ h'(m) & -D_\varphi \left(\frac{k\pi}{L} \right)^2 + \frac{\alpha_\varphi}{\zeta} - \beta_\varphi \end{bmatrix}.$$

In definitiva, il sistema adoperato per la trattazione del modello matematico (20) risulta una semplificazione di un modello più generico nel quale i punti di equilibrio potrebbero presentare delle instabilità introdotte dalle scelta di $h(M)$ e $\chi(\varphi)$, oltre che di ζ , che invece non influenzano il caso di interesse per questo studio.

3. Simulazioni numeriche e risultati

Le simulazioni condotte per poter analizzare l'interazione tra le due differenti specie cellulari sono basate sulla semplificazione del dominio: la struttura del chip microfluidico è composta da due camere di dimensioni $100\mu m \times 1000\mu m$ [7], collegate tra loro da $N = 14$ micro-canali di dimensioni $500\mu m \times 12\mu m$, distanziati tra loro di $55\mu m$, come mostrato in **Fig. 13**.

Nella camera di sinistra sono poste le cellule tumorali con una concentrazione iniziale espressa nel seguente modo:

$$T_0 = 10^{-3} e^{-\frac{x^2+(y-500)^2}{1000}} + 10^{-3} e^{-\frac{x^2+(y-1000)^2}{1000}} + 10^{-3} e^{-\frac{x^2+y^2}{1000}}$$

mentre nella porzione destra della geometria sono collocate le cellule immunitarie con un valore di partenza pari a $M_0 = 5$ confinato alle $x \in [670\mu m, 700\mu m]$. La scelta di imporre suddetta condizione iniziale per le cellule immunitarie permette di visualizzare il moto migratorio dalla camera destra alla sinistra attraverso i micro-canali.

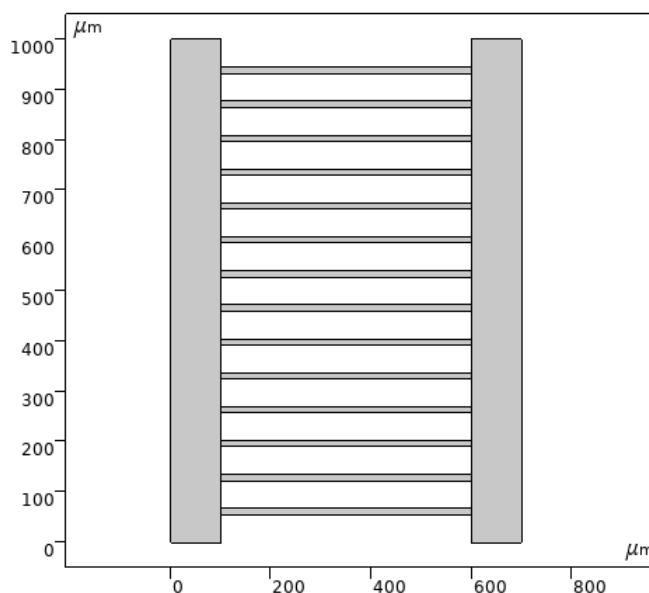


Figura 13: Geometria del sistema: rettangolo sinistro con cellule tumorali e rettangolo destro con cellule immunitarie collegati da $N = 14$ micro-canali.

Per le due restanti variabili del sistema, ovvero φ e ω , la concentrazione è inizializzata a 0 (**Fig. 14**).

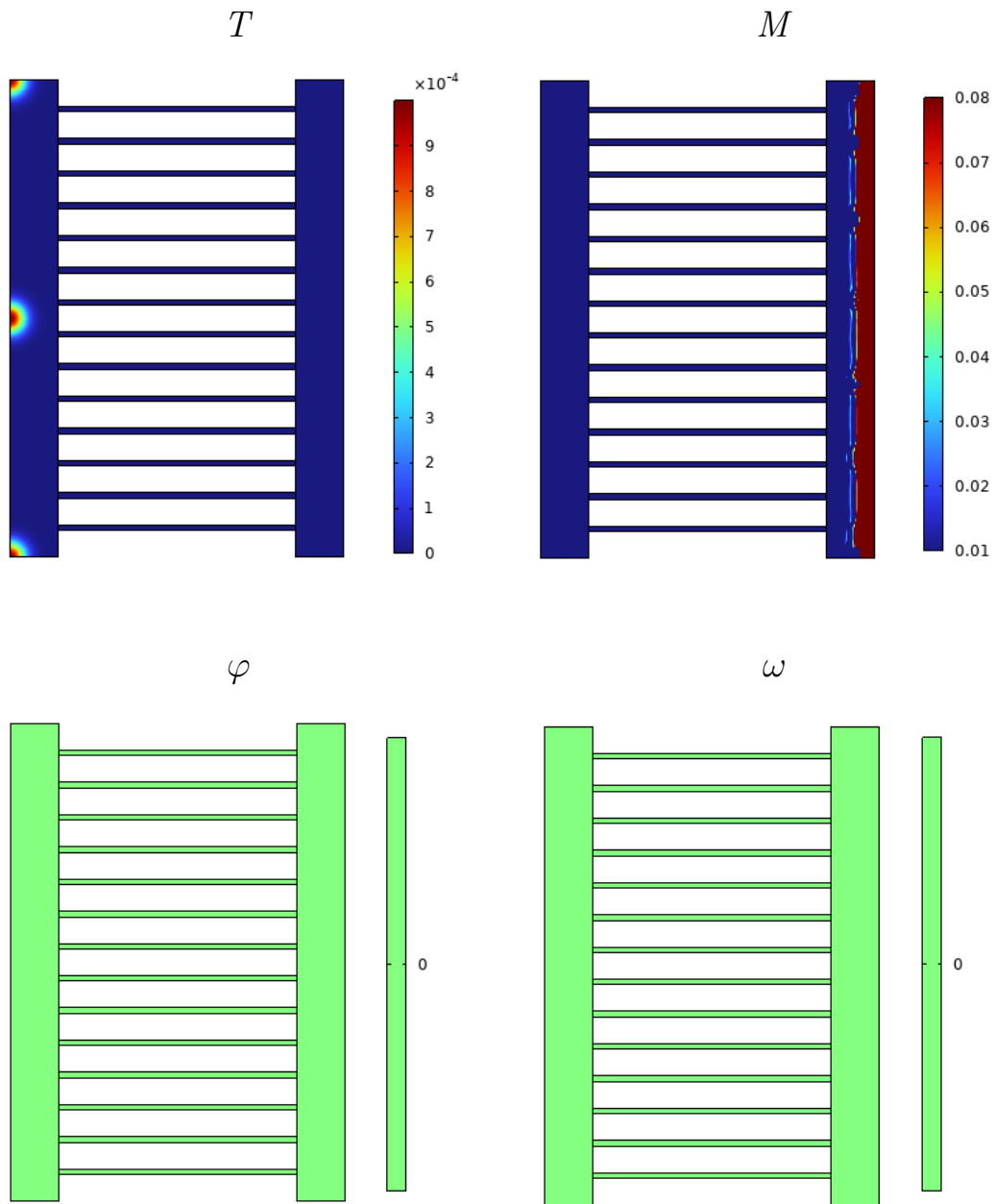


Figura 14: Concentrazioni iniziali delle variabili adimensionali del modello (1).

Sull'intero dominio sono state poste delle condizioni al bordo di flusso nullo. Le simulazioni sono state svolte con il software *COMSOL Multiphysics* ed i parametri utilizzati sono riportati nella **Tabella 1**.

Al dominio è stata applicata una mesh quadrata *extra-fine* con dimensione del singolo quadrato che varia da un minimo di $0.075\mu m$ ad un massimo di $20\mu m$. I test numerici effettuati analizzano il comportamento delle cellule tumorali T , delle cellule immunitarie M e delle sostanze chimiche prodotte φ e ω in un intervallo di tempo $\Delta t = [0s, 500s]$. In particolare, il focus del lavoro è quello di valutare l'interazione delle cellule in risposta agli stimoli chemiotattici ricevuti, considerando dapprima differenti definizioni della funzione di sensibilità $\chi(\varphi)$, avendo supposto nullo il termine di proliferazione cellulare; in seguito, sono mostrati i due scenari sperimentali: caso trattato e non per le cellule tumorali.

3.1. Definizioni differenti della funzione di sensitività $\chi(\varphi)$

3.1.1. Modello base della funzione di sensitività chemiotattica $\chi(\varphi)$

Il primo step proposto è il più semplice e consiste nel definire $\chi(\varphi)$ nel seguente modo:

$$\chi(\varphi) = k_1. \quad (21)$$

Così facendo, il moto direzionale è gestito dal gradiente di φ .

Le cellule tumorali diffondono radialmente attorno alle zone nelle quali sono state disposte inizialmente (Vedi **Fig. 15**); per $t = 50s$ si osserva il fenomeno di canalizzazione da parte delle cellule tumorali, che si riducono nel tempo a causa della diffusione della sostanza chimica ω prodotta dalle cellule immunitarie per annientare le cellule maligne. Infatti l'attrazione da parte della sostanza avviene prevalentemente nei punti in cui sono collocate le concentrazioni iniziali maggiori di cellule tumorali e si manifesta sotto forma di rigonfiamenti in corrispondenza di tali posizioni spaziali. L'effetto dell'azione delle cellule immunitarie è coerente con la riduzione della concentrazione delle cellule tumorali da un'ordine di grandezza di 10^{-4} a 10^{-6} per $t = 500s$.

In risposta all'azione delle cellule tumorali, le cellule immunitarie diffondono nell'immediato a causa della elevata diffusione, infatti modificano prontamente lo stato iniziale, nel quale erano confinate ad una porzione della camera (**Fig. 14**), introducendosi nei canali (Vedi **Fig. 16**), per contrastare l'avvento delle cellule tumorali. In questo primo caso, l'effetto del chemioattraente φ è impercettibile, infatti il percorso delle cellule immunitarie pare proseguire per pura diffusione per un certo periodo. Con lo scorrere del tempo la situazione sembra quasi diventare stazionaria e poche cellule immunitarie raggiungono la destinazione desiderata.

Le sostanze chimiche φ e ω seguono l'andamento delle cellule che le producono, aumentando nel tempo la loro concentrazione, per far sì che eseguano il ruolo per il quale sono generate (**Fig. 17** e **Fig. 18**).

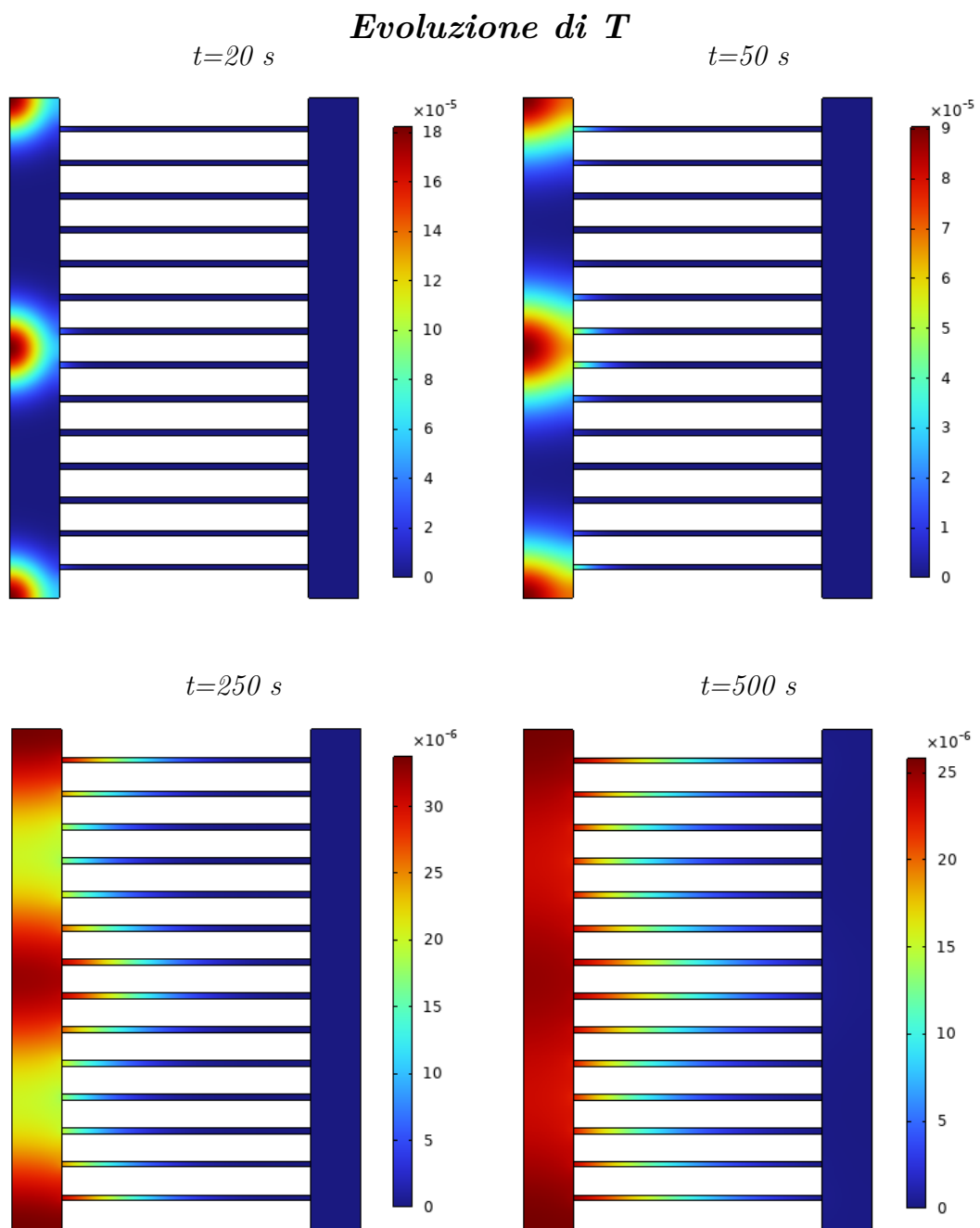


Figura 15: *Evoluzione della concentrazione di cellule tumorali per sensibilità chemiotattica costante (21).*

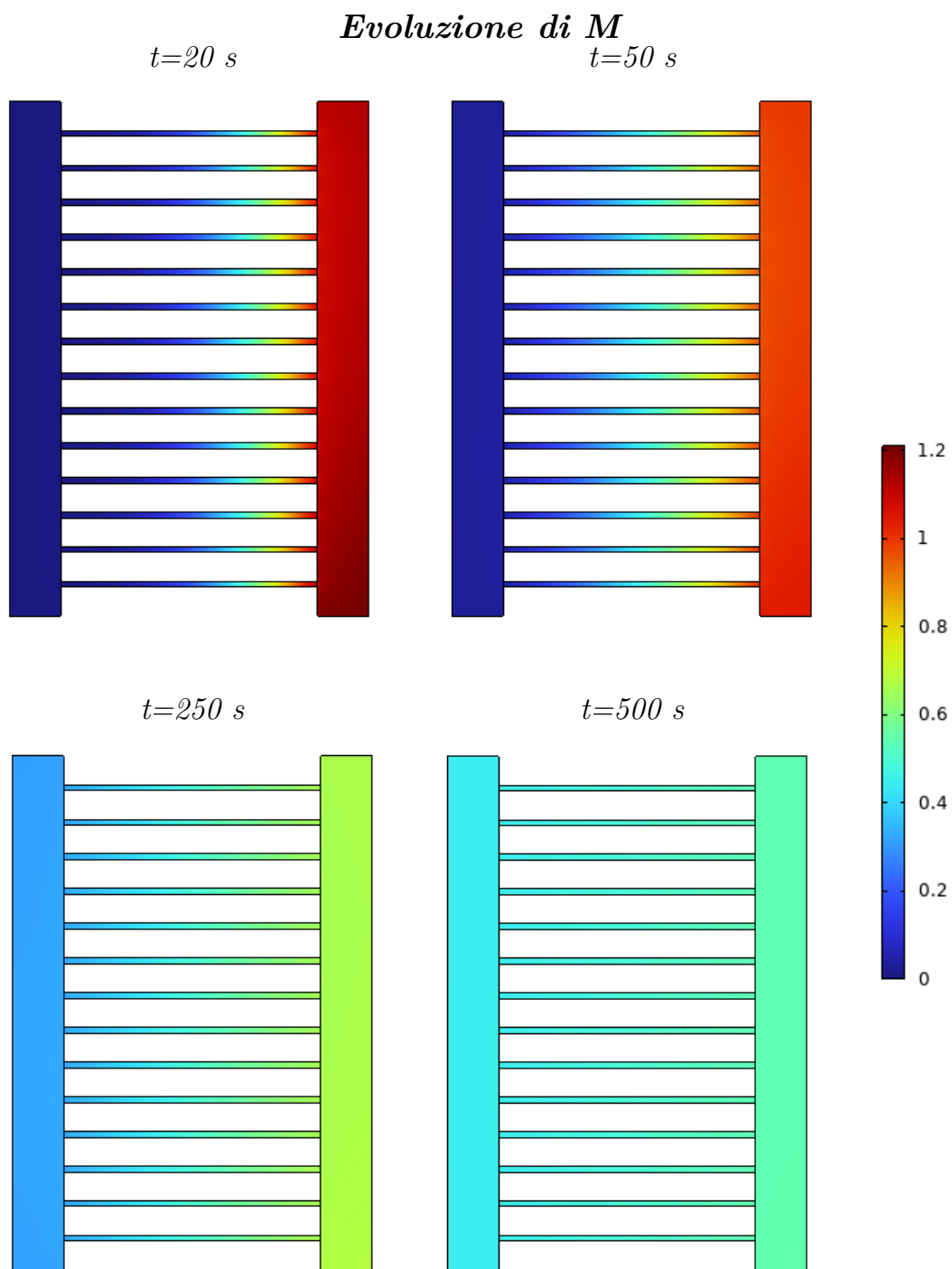


Figura 16: *Evoluzione della concentrazione di cellule immunitarie per sensibilità chemiotattica costante (21).*

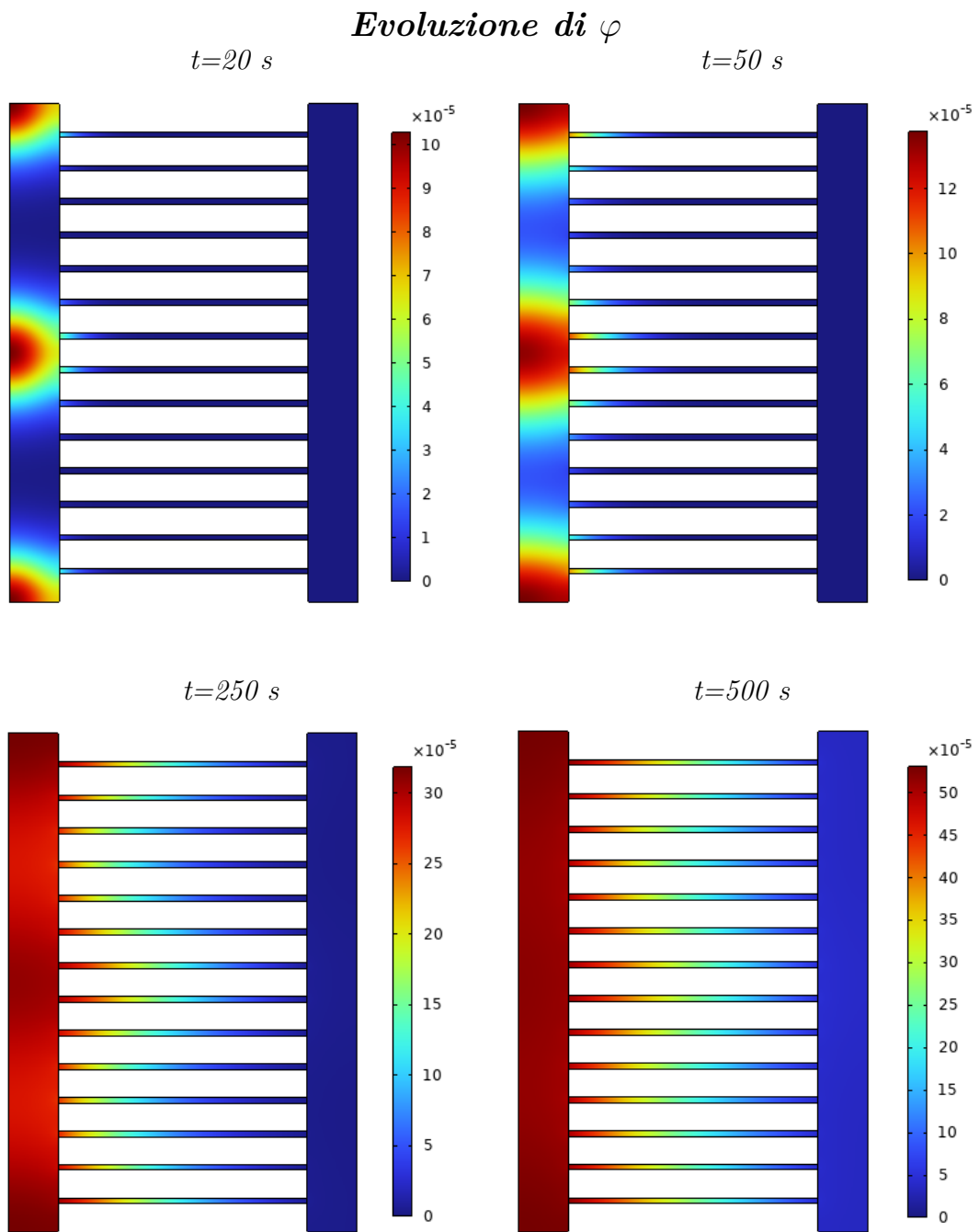


Figura 17: *Evoluzione della concentrazione della sostanza chimica φ prodotta dalle cellule tumorali per sensibilità chemiotattica costante (21).*

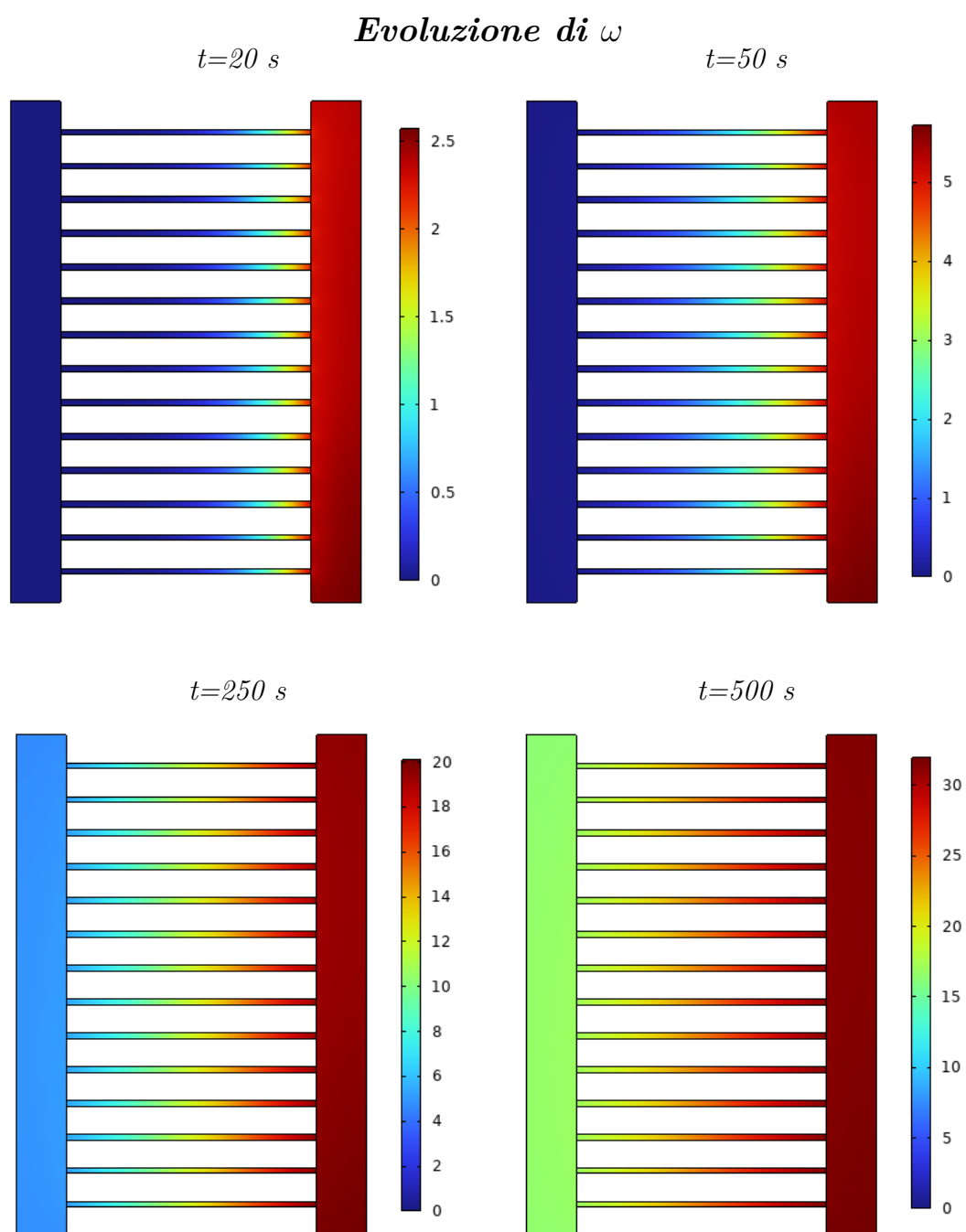


Figura 18: *Evoluzione della concentrazione della sostanza chimica ω prodotta dalle cellule immunitarie per sensibilità chemiotattica costante (21).*

3.1.2. Saturazione del recettore nella funzione di sensitività $\chi(\varphi)$

Come già evidenziato in precedenza, la definizione di una sensibilità costante non genera alcun effetto sulle cellule immunitarie: queste ultime non risentono dell'attrazione della sostanza chimica φ prodotta dalle cellule tumorali. Per cui, per rendere quanto più realistico il modello, è necessario ricostruire in maniera più accurata la chemiotassi presente nell'equazione delle cellule benigne del sistema (1). Sia

$$\chi(\varphi) = \frac{k_1}{(k_2 + \varphi)^2}. \quad (22)$$

Si osserva come l'evoluzione temporale delle cellule tumorali rimanga del tutto invariata, così come il chemioattraente da esse prodotto φ (**Fig. 19** e **Fig. 21**), ciò è probabilmente dovuto ad una limitata influenza di ω nel tasso di decadimento $\lambda(\omega)$, che ne impedisce un radicale cambiamento.

Quanto analizzato per le cellule tumorali non è riproponibile per le cellule immunitarie, basti notare la **Fig. 20**.

Con l'introduzione di una sensibilità dipendente da φ , l'effetto attrattivo generato dal chemioattraente è ben visibile, soprattutto nelle zone dove sono presenti concentrazioni più elevate di cellule maligne. Tale aspetto attrattivo è evidenziato dai rigonfiamenti nella parte superiore, centrale e inferiore del dominio, dove l'immunità sta prendendo il sopravvento.

La differenza tra le due formulazioni proposte (21) e (22) che caratterizzano il moto chemiotattico risiede nell'aver definito, in prima battuta, la chemiotassi dipendente esclusivamente dal gradiente della sostanza chimica φ : ciò permette la migrazione di poche cellule immunitarie nella porzione sinistra della geometria in $t = 500s$ (**Fig. 16**), in quanto lungo i canali il gradiente aumenta vertiginosamente, avendo ridotto le dimensioni. Infatti, le cellule sono inizialmente concentrate nella camera di altezza $1000\mu m$ e larghezza $100\mu m$, incanalandosi nei micro-canali le dimensioni cambiano e si passa ad una altezza due ordini di grandezza inferiori rispetto alle camere principali, a fronte di una lunghezza pari a $500\mu m$. Tale estensione, però, non è sufficiente ad eguagliare le dimensioni di partenza. Introducendo la dipendenza da φ stesso, l'elevato gradiente assunto nei canali è contrastato da un considerevole valore assunto dalla concentrazione chimica (**Fig. 20**). Dunque il moto procede, grazie alla componente diffusiva dell'equazione, che diviene dominante.

In maniera speculare, anche la sostanza chimica prodotta dalle cellule immunitarie, ovvero ω , modifica la sua evoluzione nel tempo e segue l'andamento delle sue generatrici. Se in precedenza (Vedi **Fig. 18**) la sostanza non interagiva con le cellule tumorali e con il chemioattraente, in tal caso (Vedi **Fig. 22**) ω interviene sul rettangolo sinistro del chip e nella "fase di ritorno" per $t = 250s$ presenta anch'essa delle sporgenze in corrispondenza delle zone ad elevata concentrazione immunitaria. Infatti, anche la quantità di sostanza presente nell'ambiente mostra un range di variazione differente: si passa da $\omega \in [18,30]$ ad $\omega \in [10,40]$.

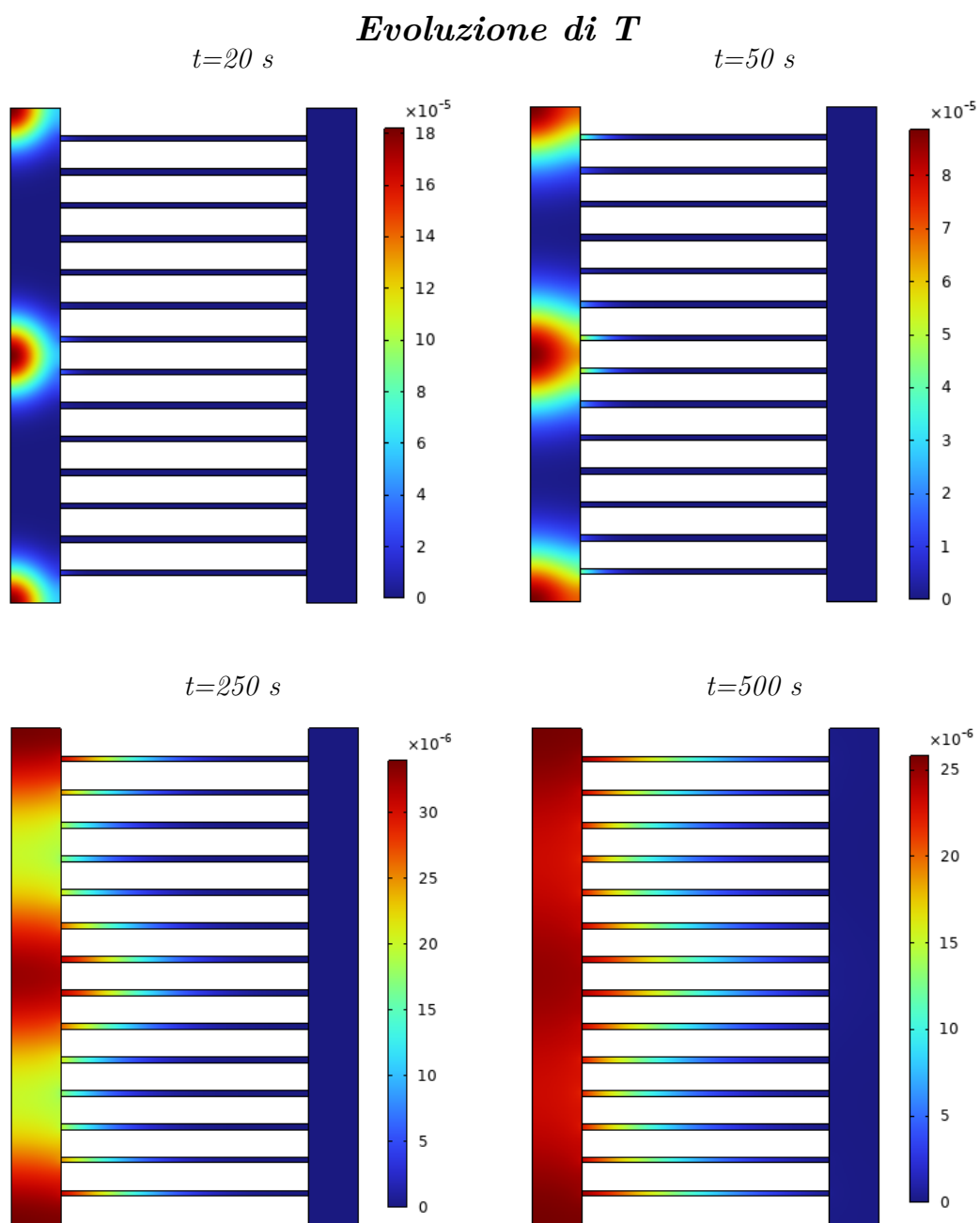


Figura 19: *Evoluzione della concentrazione delle cellule tumorali per sensibilità chemiotattica definita in (22).*

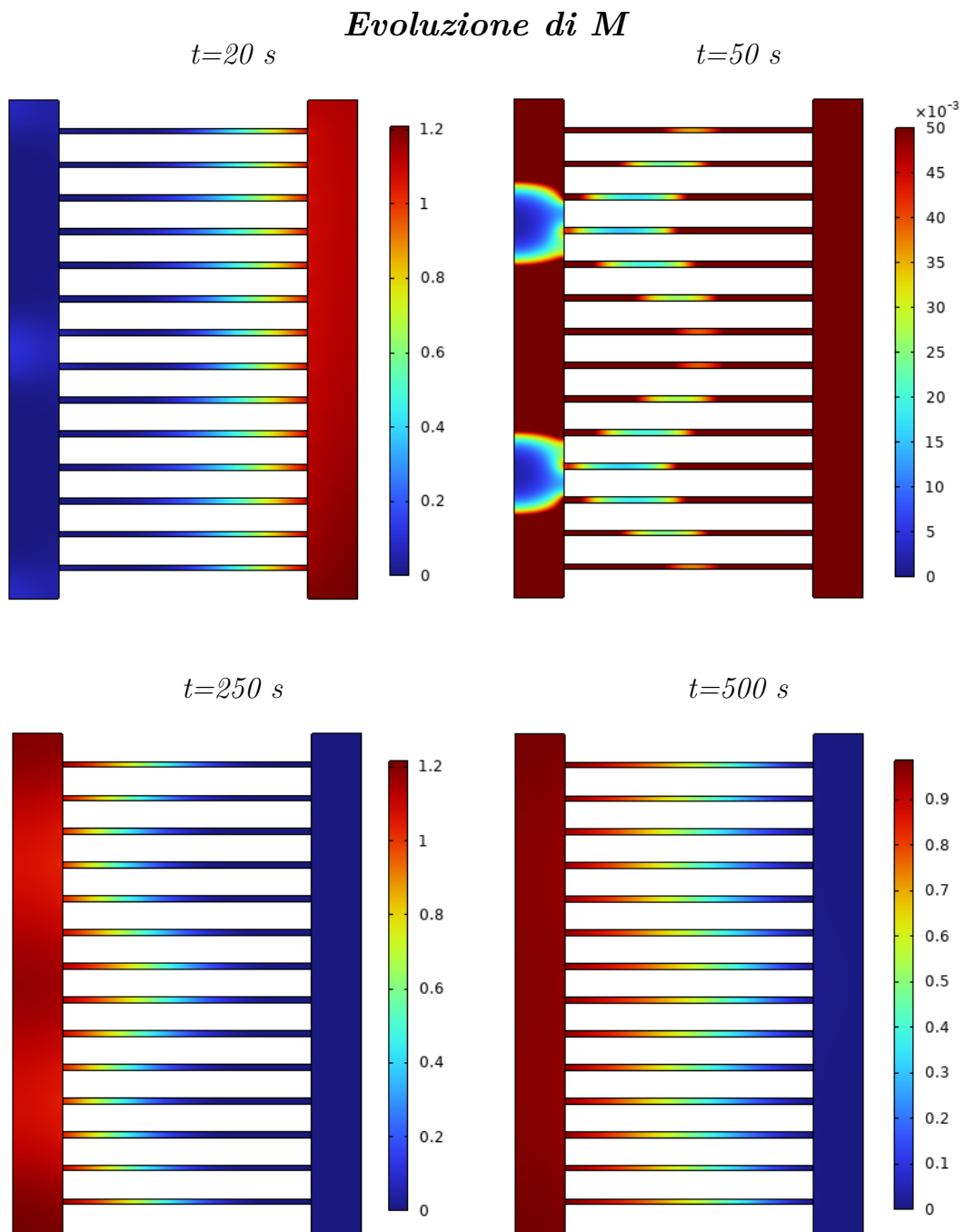


Figura 20: *Evoluzione della concentrazione delle cellule immunitarie per sensibilità chemiotattica definita in (22).*

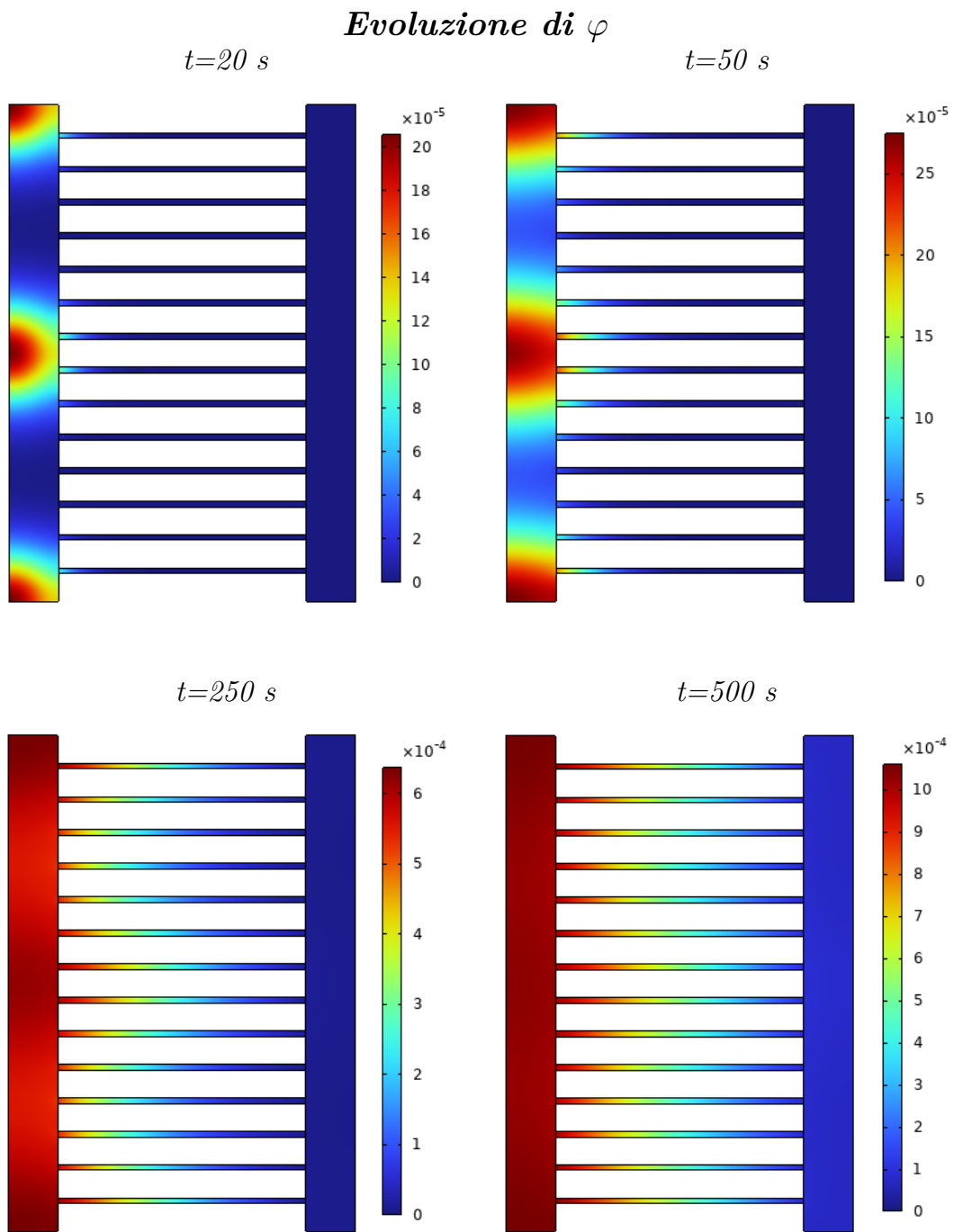


Figura 21: *Evoluzione della concentrazione della sostanza chimica φ prodotta dalle cellule tumorali per sensibilità chemiotattica definita in (22).*

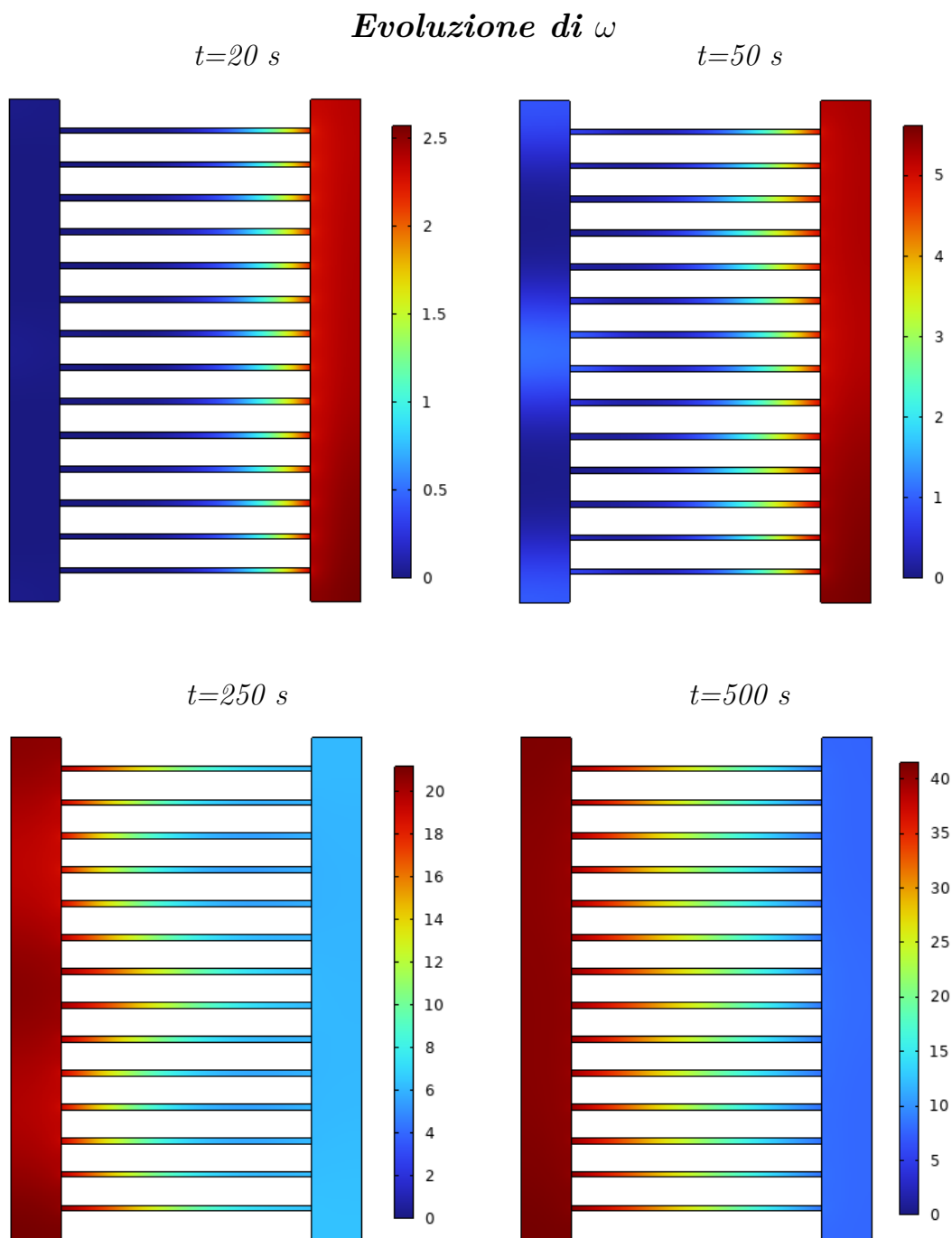


Figura 22: *Evoluzione della concentrazione della sostanza chimica ω prodotta dalle cellule immunitarie per sensibilità chemiotattica definita in (22).*

3.1.3. Sovraffollamento cellulare modellizzato dalla funzione di sensibilità $\chi(\varphi)$

In ultima analisi, la sensibilità chemiotattica è stata ulteriormente modificata per simulare un sovraffollamento cellulare, con l'introduzione di una quantità massima di concentrazione delle cellule immunitarie:

$$\chi(\varphi) = \frac{k_1}{(k_2 + \varphi)^2} \left(1 - \frac{M}{M_{max}}\right) \quad (23)$$

con $M_{max} = 5$, pari dunque alla concentrazione iniziale.

Anche in questo caso il comportamento assunto dalle cellule tumorali, e dunque dal chemioattraente da esse prodotto, non varia nel tempo rispetto ai casi precedenti. Le cellule maligne concentrate inizialmente in tre punti del dominio sinistro diffondono radialmente, sino ad occupare l'intera camera, per poi incanalarsi nel dominio di interazione con le cellule immunitarie. L'andamento osservato nel tempo presenta dei rigonfiamenti in corrispondenza delle maggiori concentrazioni di cellule benigne (**Fig. 23**).

Analogamente, la sostanza chimica φ interagisce con le cellule immunitarie, attraendole a se (**Fig. 25**).

La differenza sostanziale rispetto ai due casi precedenti risiede nell'evoluzione temporale della concentrazione delle cellule immunitarie (Vedi **Fig. 24**).

In accordo con le intuizioni teoriche mostrate già in precedenza, le cellule benigne invadono la porzione sinistra del dominio, entrando a contatto con le cellule tumorali. Il loro moto non è rettilineo, bensì è registrata una maggiore quantità di cellule immunitarie in corrispondenza di una presenza più consistente di cellule maligne e dunque di chemioattraente φ .

La diversità dalla formulazione 24 è l'esistenza di questo sovraffollamento di cellule immunitarie: se con la precedente sensibilità, la concentrazione delle cellule immunitarie è maggiore solo nei canali direttamente connessi con le quantità iniziali di cellule tumorali, nel caso in analisi, la maggior concentrazione di cellule immunitarie si estende anche ai canali limitrofi.

Ciò è dovuto all'introduzione di un termine soglia nella definizione della sensibilità chemiotattica, indicato dalla quantità M_{max} .

La sostanza chimica ω manifesta, invece, lo stesso andamento del problema precedente (**Fig. 26**).

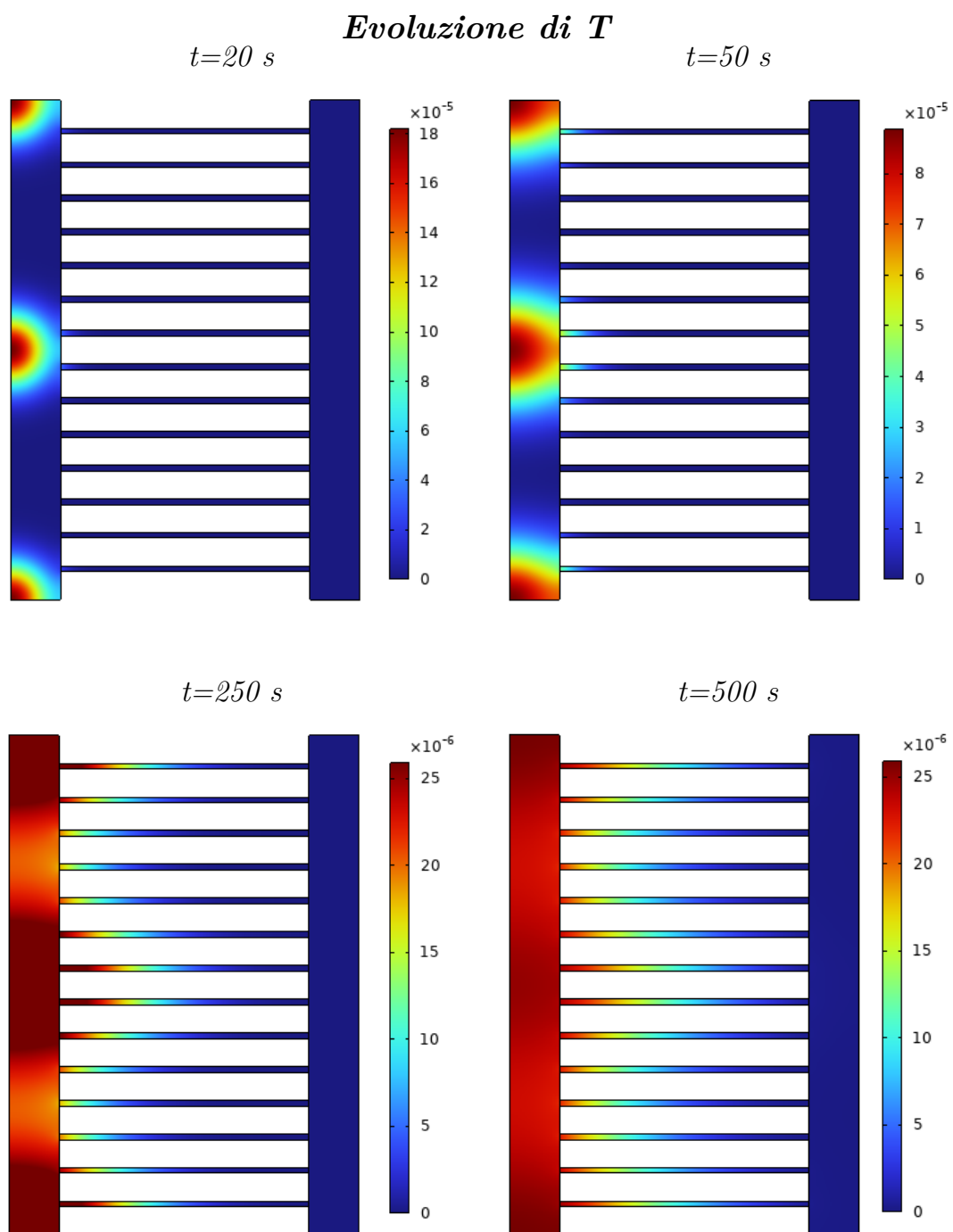


Figura 23: *Evoluzione della concentrazione delle cellule tumorali per sensibilità chemiotattica definita in (23).*

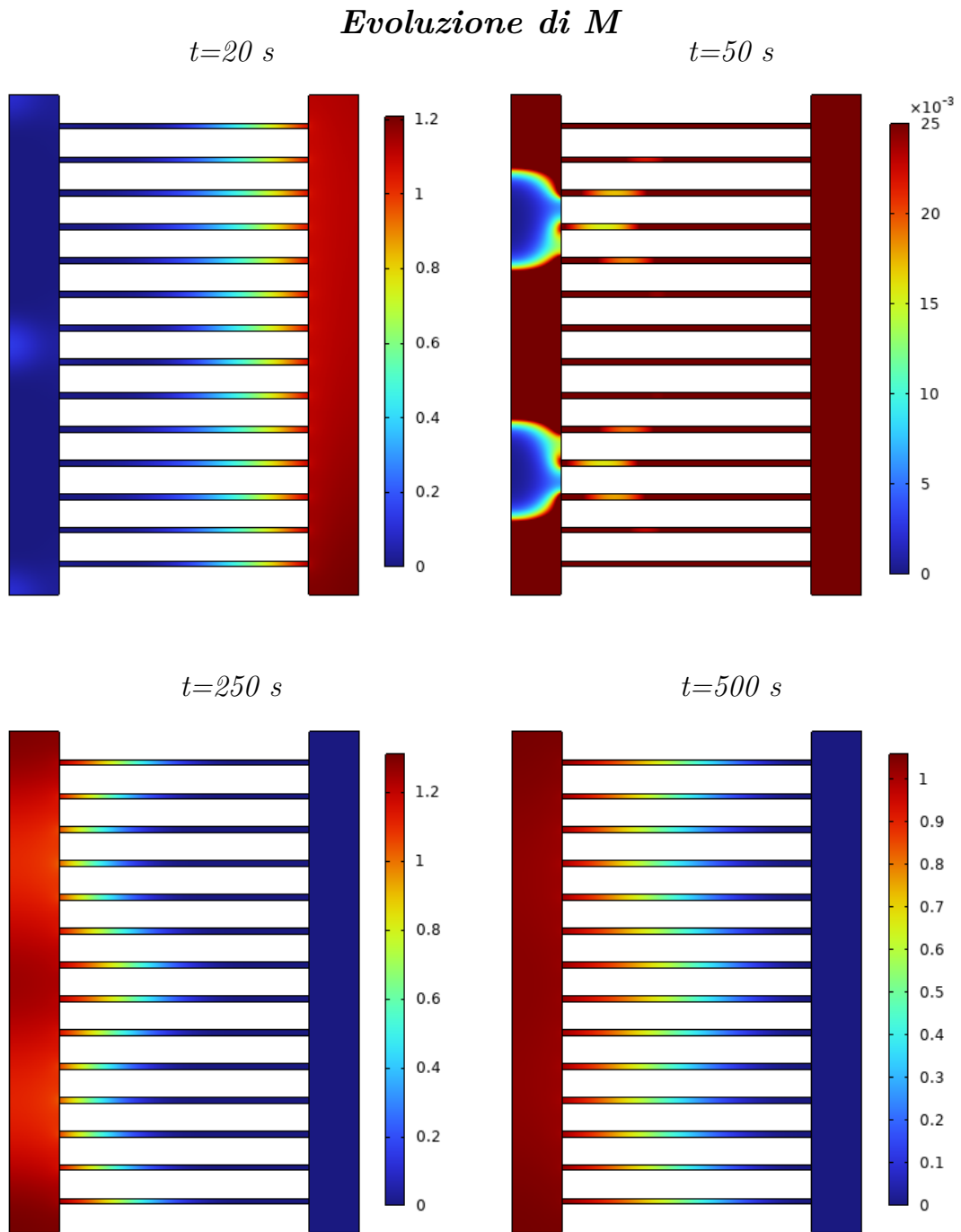


Figura 24: *Evoluzione della concentrazione delle cellule immunitarie per sensibilità chemiotattica definita in (23).*

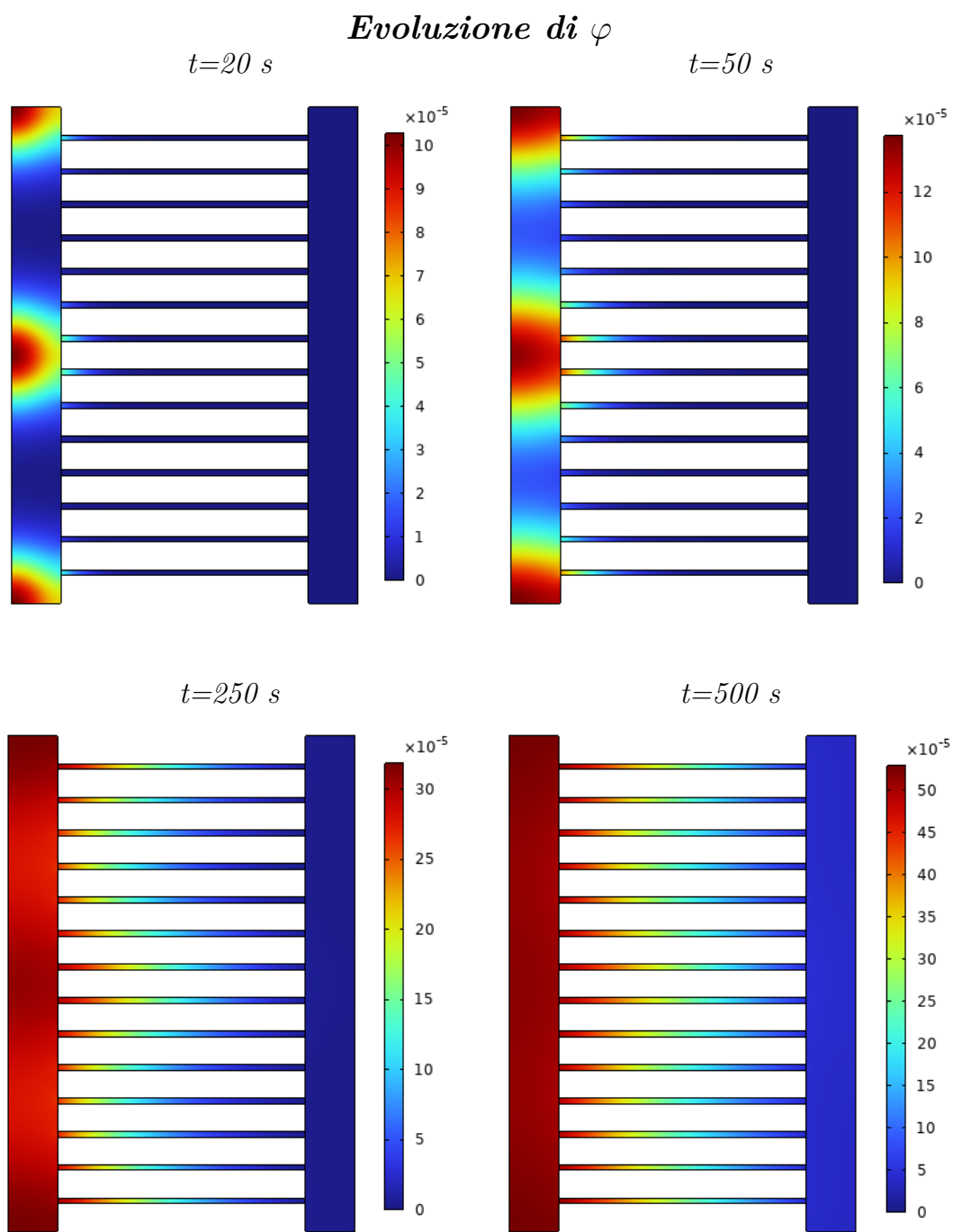


Figura 25: *Evoluzione della concentrazione della sostanza chimica φ prodotta dalle cellule tumorali per sensibilità chemiotattica definita in (23).*

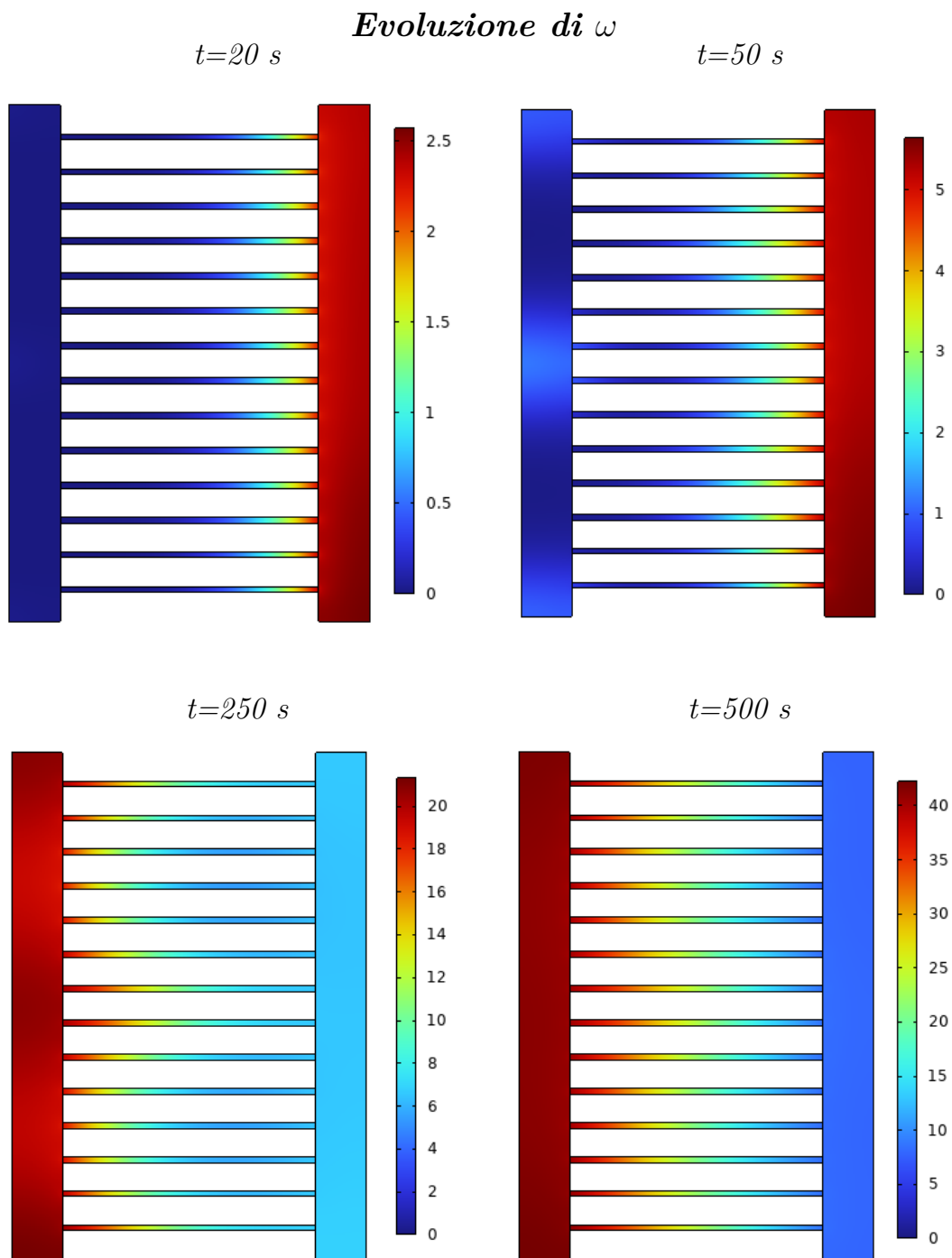


Figura 26: *Evoluzione della concentrazione della sostanza chimica ω prodotta dalle cellule immunitarie per sensibilità chemiotattica definita in (23).*

3.2. Scenari possibili

Lo step successivo all'analisi chemotattica presentata riguarda lo sviluppo dei due scenari proposti dalle sperimentazioni.

Durante gli esperimenti, i setting adoperati sono principalmente due:

- scenario non trattato: in questo primo caso le cellule tumorali risultano prive di alcun trattamento precedente, dunque le si considera nel loro stadio primitivo;
- scenario trattato: una seconda possibilità è quella di analizzare il sistema, trattando dapprima gli aggregati tumorali con un farmaco chemioterapico, in maniera tale da valutare possibili terapie per contrastare lo sviluppo della massa maligna.

Nei due scenari presentati, il comportamento delle cellule tumorali e immunitarie è differente: quando gli aggregati tumorali non sono precedentemente trattati, essi tendono ad invadere velocemente il tessuto, proliferando; di contro le cellule immunitarie generano una risposta, ma in poche quantità riescono a raggiungere la camera sinistra del chip, in quanto in questo caso le cellule tumorali non rilasciano fattori chemiotattici, quindi i macrofagi non riescono a riconoscere le cellule tumorali come agenti patogeni.

Caso opposto si presenta quando gli aggregati tumorali sono precedentemente trattati: le masse maligne tendono ad espandersi molto lentamente, scernendo il fattore chemiotattico, e dunque consentono una attività da parte delle cellule immunitarie che sono abili nell'individuare gli aggregati e nel rilasciare la sostanza chimica che ne causa la morte.

Di seguito sono riportate le simulazioni numeriche effettuate con il software *COMSOL Multiphysics*. Esse sono state condotte mantenendo le stesse caratteristiche delle precedenti simulazioni, modificando però alcuni parametri, necessari alla considerazione dei diversi scenari.

In questi casi, la sensibilità chemiotattica assume la seguente forma, in accordo con le simulazioni effettuate in [1]:

$$\chi(\varphi) = \frac{k_1}{(k_2 + \varphi)^2}. \quad (24)$$

3.2.1. Cellule tumorali non trattate

Dapprima sono mostrati i risultati ottenuti analizzando lo scenario non trattato.

La conseguenza teoricamente attesa è quella di una diffusione e proliferazione rapida delle cellule tumorali, che invadono la camera di destra. Nel mentre, le cellule immunitarie rimangono confinate nella porzione di destra, non individuando le entità patologiche.

In questo particolare scenario, gli aggregati tumorali non producono la sostanza chemiotattica φ che consente il loro riconoscimento da parte delle cellule immunitarie. Dunque i parametri che subiscono una modifica rispetto a quelli riportati nella **Tab. 1** sono mostrati nel seguente schema:

Parametri	Descrizione	Unità di misura	Valore
D_M	Diffusione di M	$\mu m^2 s^{-1}$	90
D_T	Diffusione di T	$\mu m^2 s^{-1}$	150
k_T	tasso di produzione di T	s^{-1}	3×10^{-2}
α_φ	tasso di produzione di φ	s^{-1}	0
α_ω	tasso di produzione di ω	s^{-1}	0

Tabella 2: *Tabella parametri modificati per lo scenario non trattato*

Eseguendo la simulazione richiesta, i risultati ottenuti coincidono con quanto osservato sperimentalmente [17].

Le cellule tumorali in un tempo $t = 500s$ aumentano la loro concentrazione, raggiungendo un picco pari a 80, come mostrato in **Fig. 27**. Inoltre, nel medesimo lasso temporale, le cellule tumorali hanno già invaso la camera destra, seppur ancora in piccole quantità.

Il comportamento delle cellule immunitarie è diametralmente opposto (Vedi **Fig. 28**). In $t = 500s$, le cellule rimangono pressoché confinate nella loro camera di inserimento e la concentrazione si riduce leggermente, in seguito alla imminente attività degli agenti patogeni.

Inoltre, a causa della mancata *chemotaxis*, le poche cellule che riescono ad incanalarsi, si spostano parallelamente, a differenza di quanto accadeva nei casi precedentemente analizzati, in cui erano presenti dei rigonfiamenti in prossimità delle concentrazioni iniziali degli aggregati tumorali.

Come atteso, le concentrazioni della sostanza chimica φ e del *killing rate* ω sono nulle durante tutto il processo, in quanto i tassi di produzione sono posti pari a 0 (**Fig. 29**).

Le simulazioni effettuate rappresentano un input per gli studi successivi, in quanto consentono di comprendere come le cellule tumorali interagiscono con le cellule immunitarie allo stato naturale del sistema, dunque in una sorta di fase iniziale, per la quale il cancro non è ancora stato diagnosticato sul paziente.

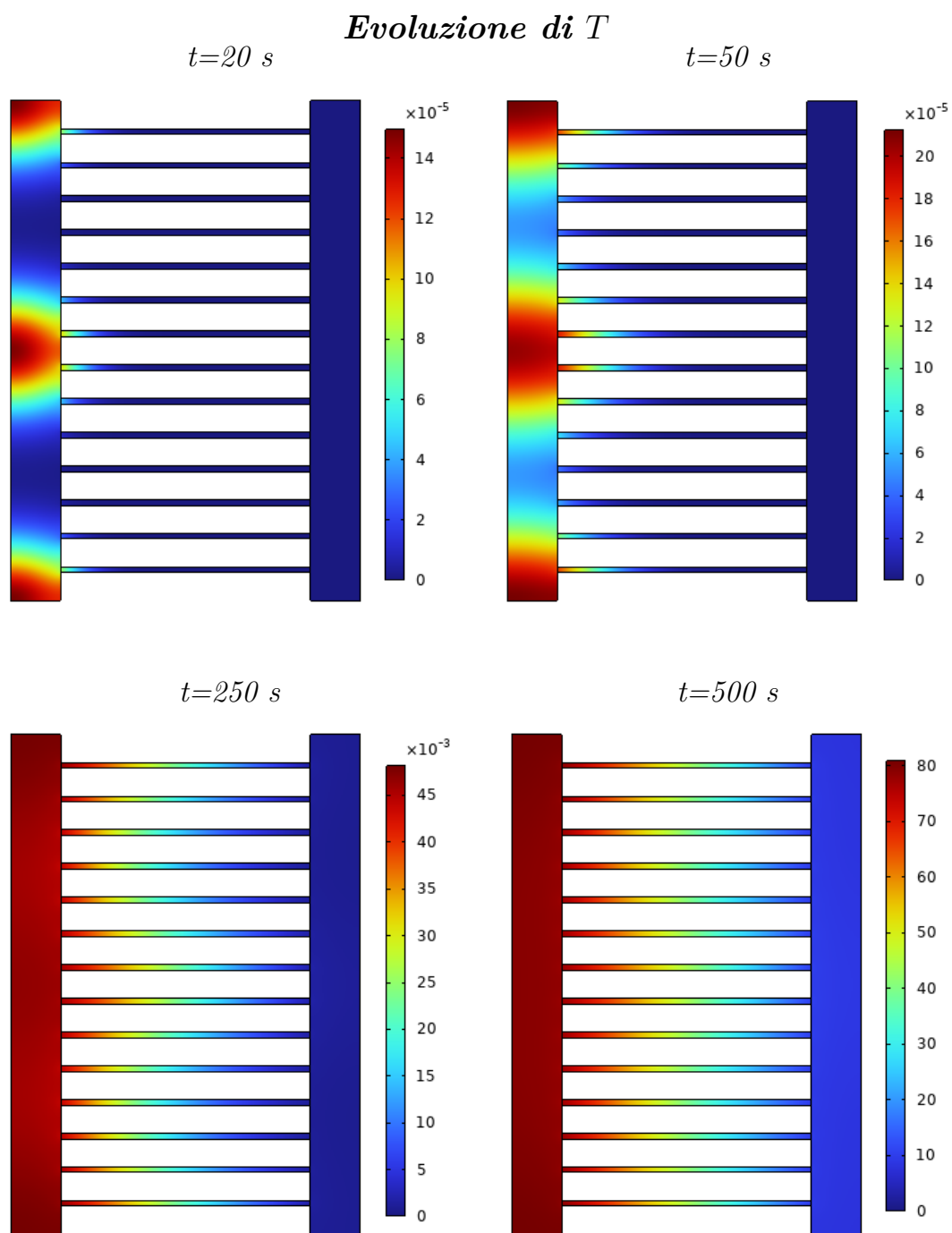


Figura 27: *Evoluzione della concentrazione delle cellule tumorali nello scenario non trattato.*

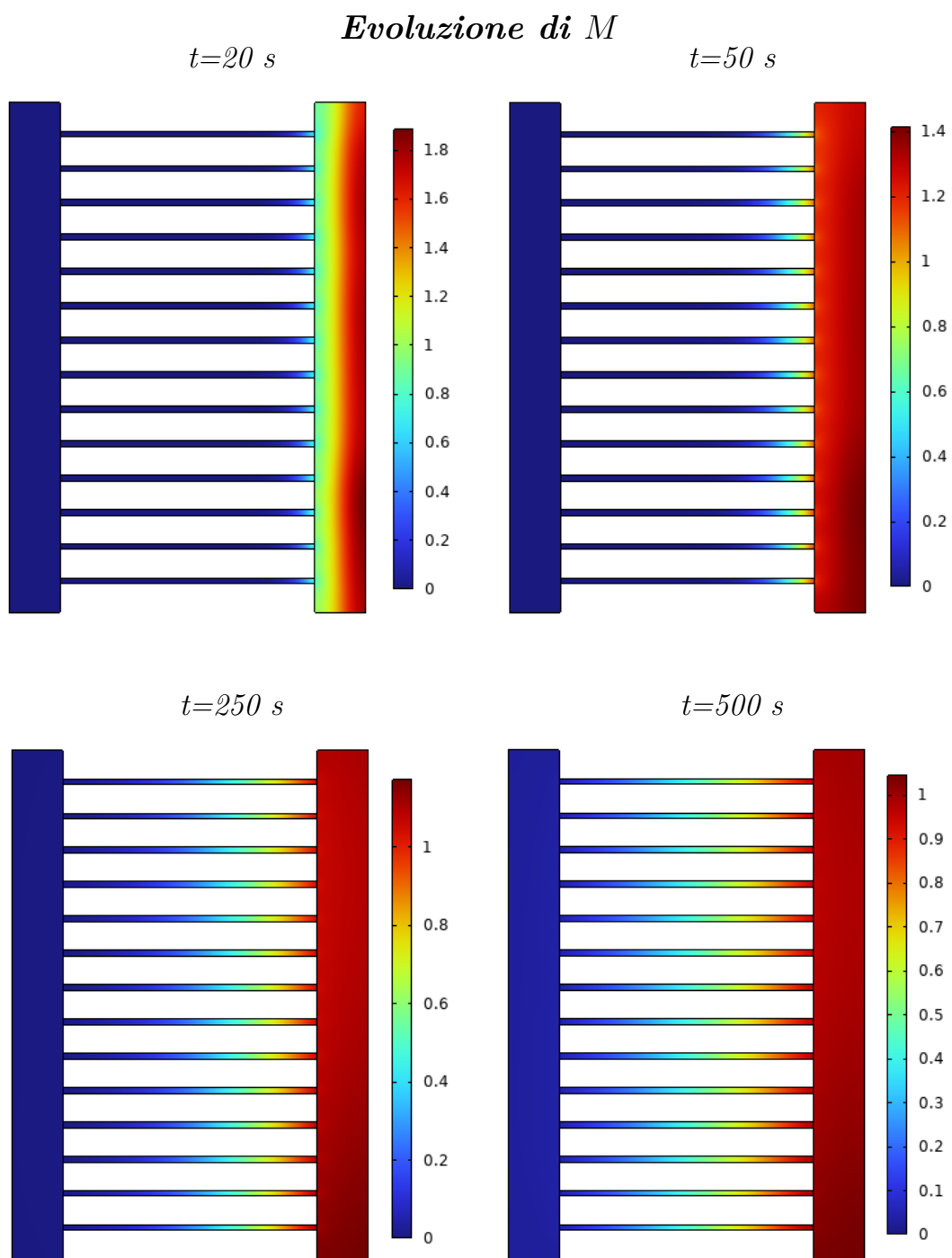


Figura 28: *Evoluzione della concentrazione delle cellule immunitarie nello scenario non trattato.*

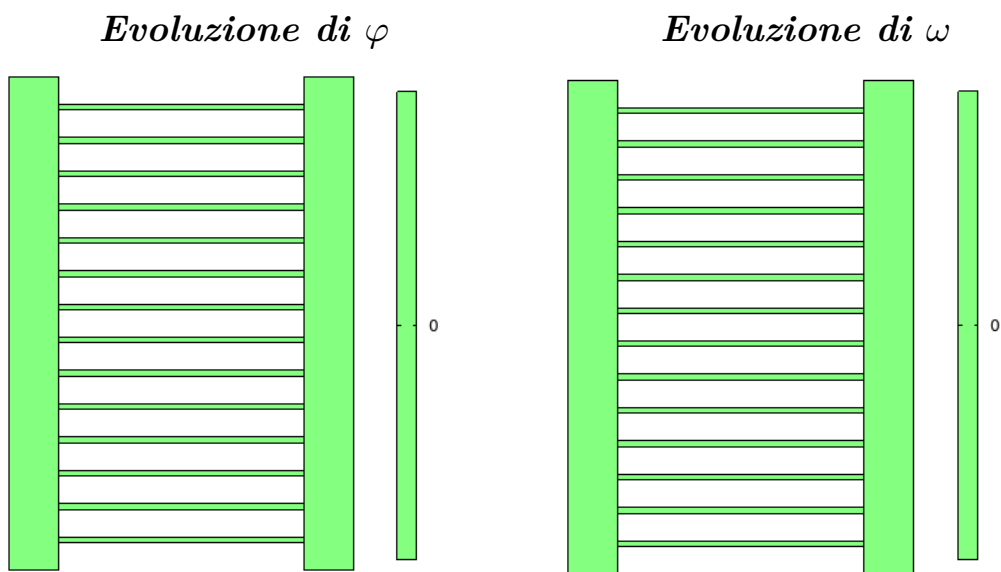


Figura 29: *Evoluzione della concentrazione della sostanza chimica φ prodotta dalle cellule tumorali (sinistra) e della concentrazione della sostanza chimica ω rilasciata dalle cellule immunitarie (destra) nello scenario non trattato.*

3.2.2. Cellule tumorali precedentemente trattate

Una volta diagnosticato il tumore nel paziente, i medici sin da subito consigliano, nei casi in cui questo fosse ritenuto necessario e possibile, di sottoporre il paziente a chemioterapia. Proprio in seguito ai recenti sviluppi nel settore chemioterapico, i ricercatori hanno effettuato numerosi esperimenti su cellule tumorali precedentemente trattate, così da aumentare l'efficienza del trattamento.

Per poter simulare l'effetto dell'inserimento di un farmaco chemioterapico, i parametri modificati, rispetto a quelli presenti nella **Tab. 1**, sono riportati nella **Tab. 3**.

Parametri	Descrizione	Unità di misura	Valore
D_T	Diffusione di T	$\mu m^2 s^{-1}$	56×10^{-1}
S	tasso massimo di secrezione delle sostanze chimiche	s^{-1}	1.9676×10^{-2}

Tabella 3: *Tabella parametri modificati per lo scenario trattato*

Con la scelta dei parametri adoperati, si osserva come, in presenza di trattamento chemioterapico, le cellule tumorali diffondono lentamente e non proliferano, a differenza di quanto accade nel caso di totale assenza di farmaco chemioterapico.

Questo comportamento da parte degli aggregati tumorali consente alle cellule immunitarie di intervenire, riconoscendo la presenza di agenti patogeni, grazie produzione della sostanza chemioattraente φ , ed eliminandoli. Infatti, la costante S che definisce il *killling rate* è notevolmente più alta rispetto ai casi analizzati.

Dalle simulazioni effettuate, si evince come le cellule tumorali rimangono confinate, diffondendo lentamente e radialmente, attorno agli aggregati cellulari inizialmente introdotti. La loro concentrazione al tempo $t = 500s$ passa da un picco di circa 80 riscontrato nel caso di assenza di trattamento (Vedi **Fig. 27**) ad un valore massimo di 3×10^{-9} , come mostrato in **Fig. 30**. Dunque, il risultato ottenuto è proprio quello teoricamente atteso.

Le cellule immunitarie raggiungono immediatamente la camera sinistra (si osservi $t = 50s$ in **Fig. 31**), attaccando direttamente gli aggregati maligni. Inoltre, l'effetto della sostanza chemiotattica φ è perfettamente visibile, poiché il moto è caratterizzato da dei rigonfiamenti in prossimità delle concentrazioni di cellule tumorali; aspetto non riscontrato nel caso precedente, in quanto non vi era alcuna produzione.

A seguito di ciò anche le sostanze chimiche φ e ω evolvono nel tempo, seguendo l'andamento delle cellule che le secernono. Dalla **Fig. 32**, si osserva l'attività del chemioattraente, che diffonde attraverso i micro-canali, ma ne riduce la sua quantità, a fronte di una notevole perdita di cellule tumorali.

Anche per la sostanza chimica ω , sono evidenti delle differenze rispetto al caso precedente. Infatti, la **Fig. 33** ne mostra una notevole produzione, in maniera particolare quando le cellule immunitarie hanno tutte raggiunto la camera sinistra, dovendo contrastare gli agenti patogeni.

Dunque la chemioterapia accompagnata dall'immunoterapia sembrerebbe generare risultati ottimali per lo studio dello sviluppo tumorale, riducendo notevolmente la concentrazione

di agenti nocivi agli organismi umani affetti da questa patologia.

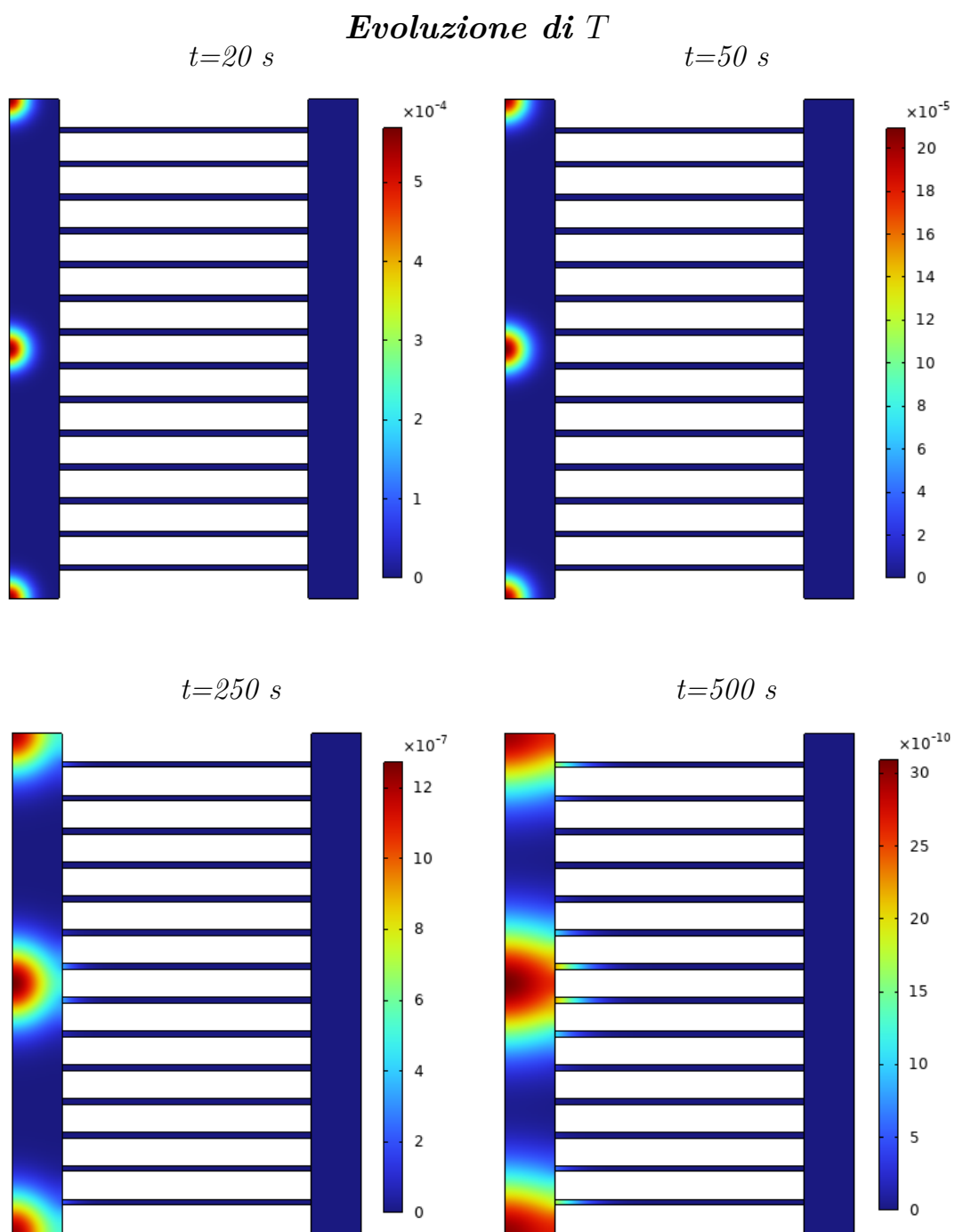


Figura 30: *Evoluzione della concentrazione delle cellule tumorali nello scenario trattato.*

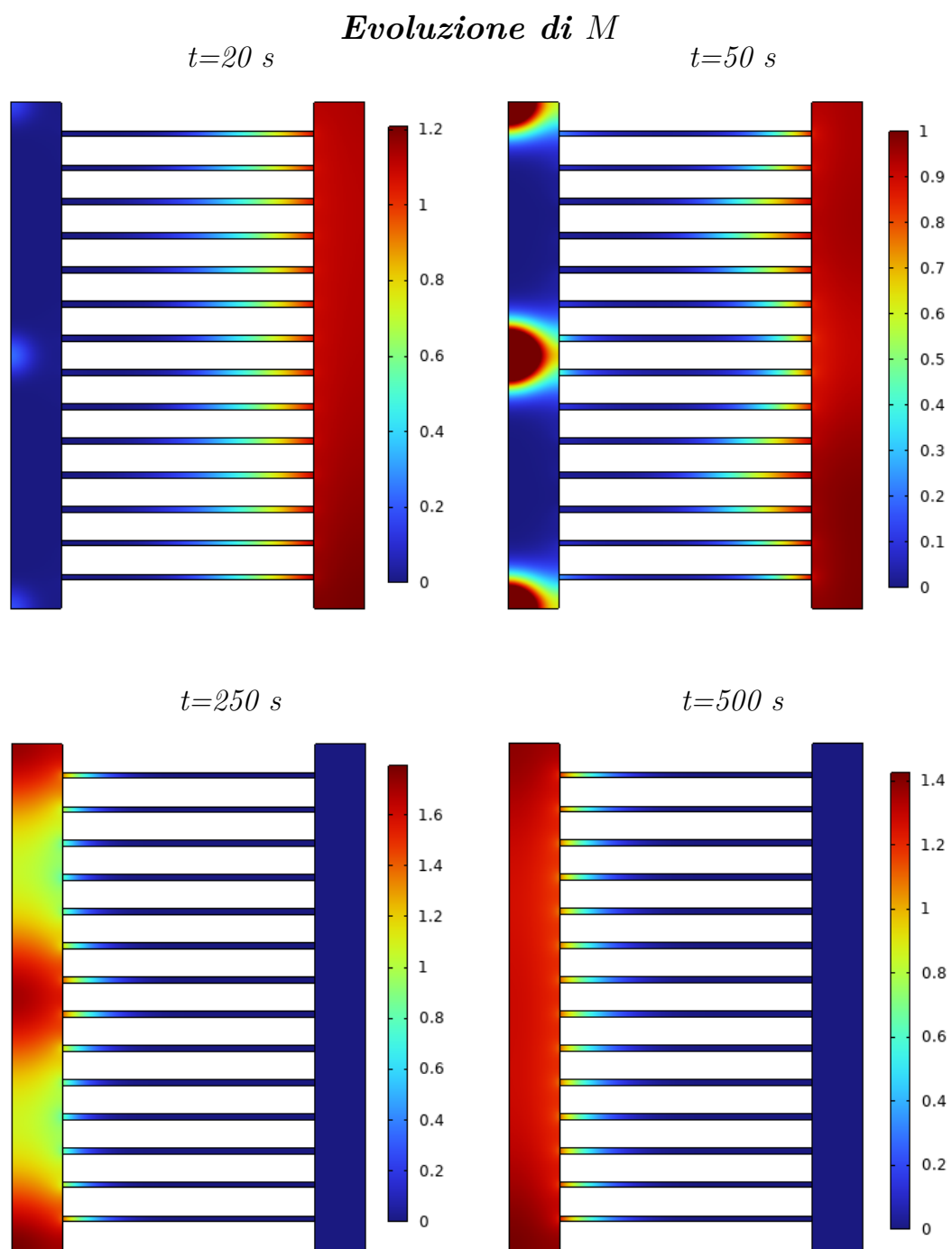


Figura 31: *Evoluzione della concentrazione delle cellule immunitarie nello scenario trattato.*

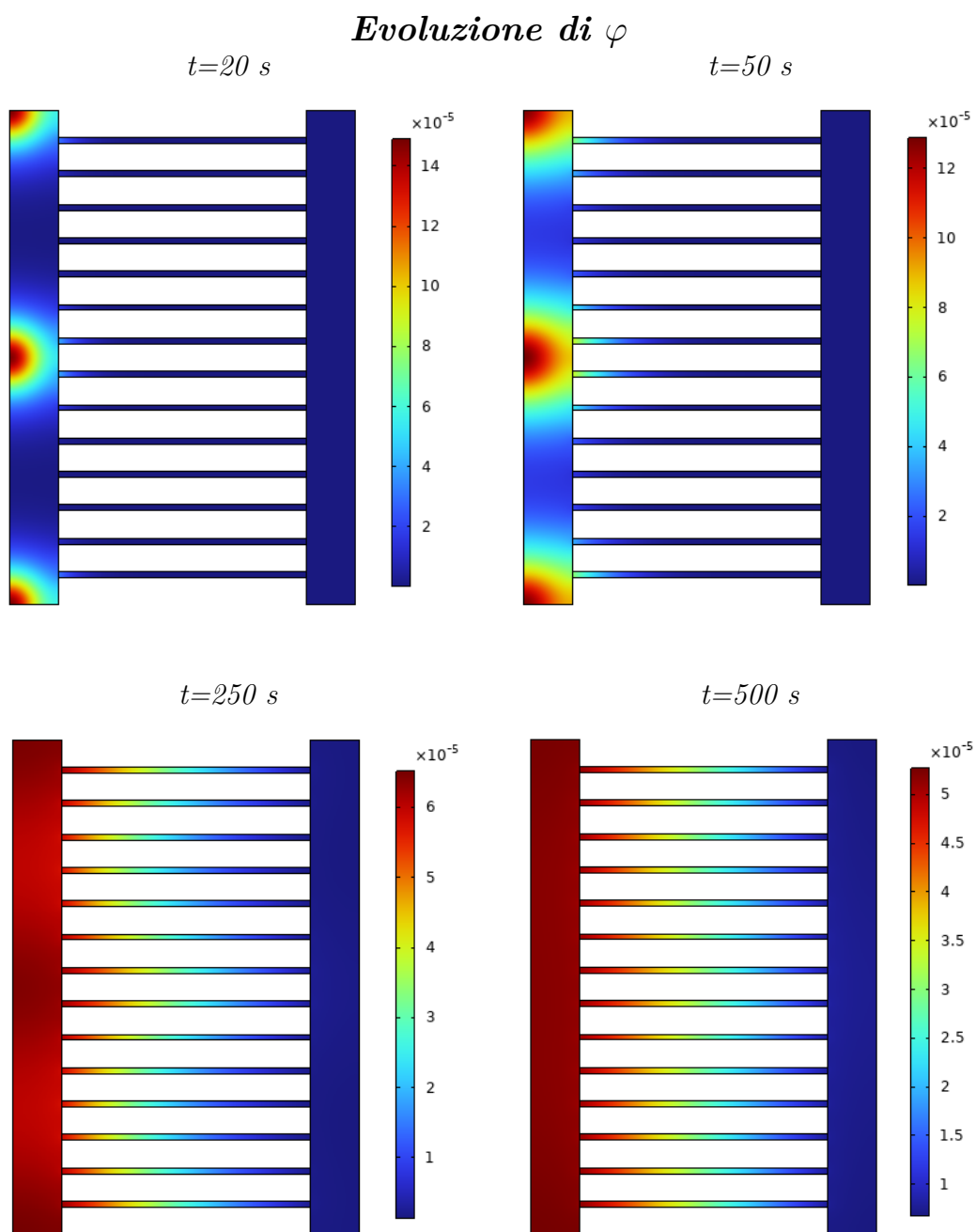


Figura 32: *Evoluzione della concentrazione della sostanza chimica φ prodotta dalle cellule tumorali nello scenario trattato.*

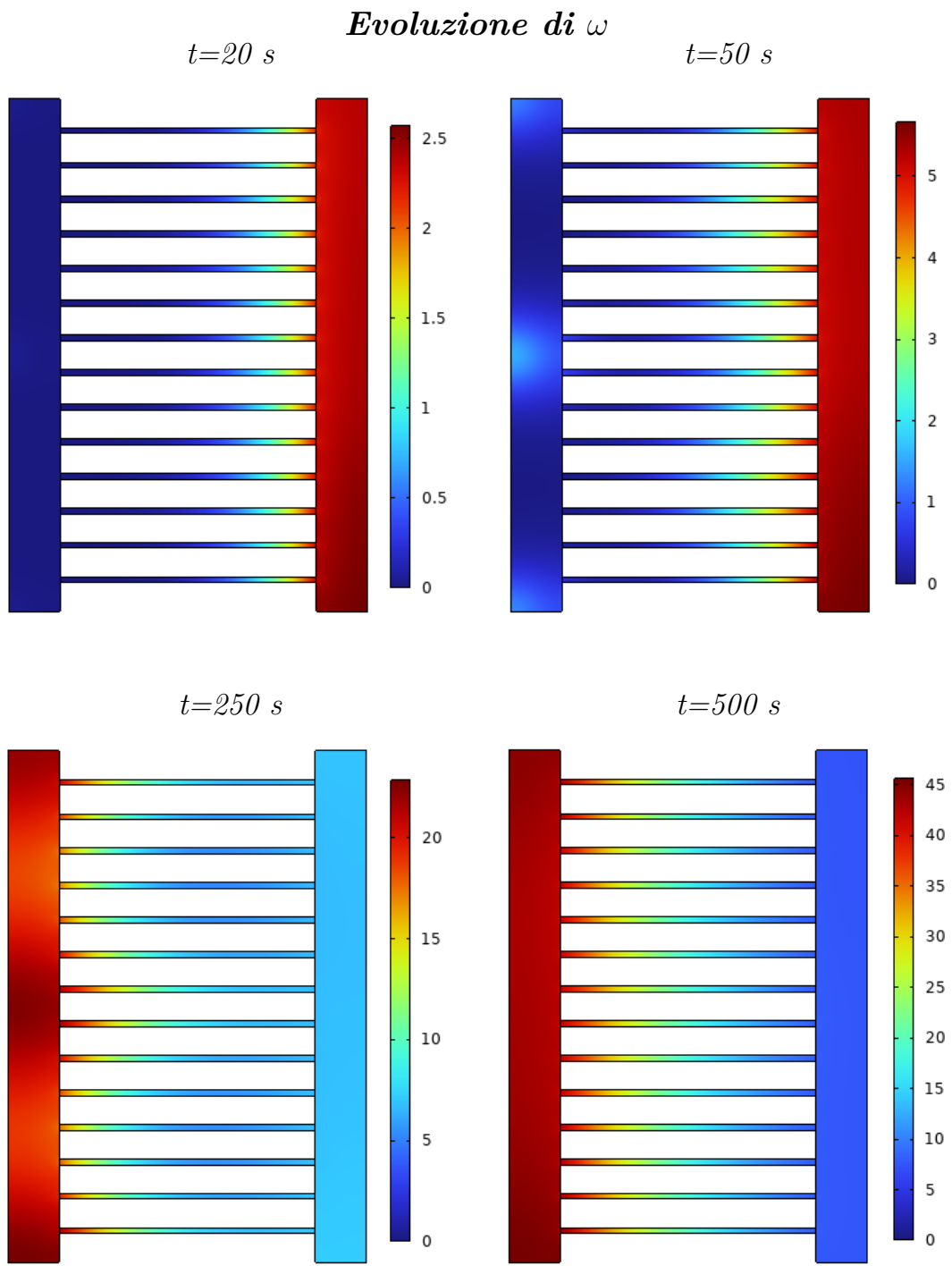


Figura 33: *Evoluzione della concentrazione della sostanza chimica ω prodotta dalle cellule immunitarie nello scenario trattato.*

4. Conclusioni

Lo studio di specie cellulari interagenti su chip microfluidici consente molte applicazioni nel settore biologico. In primo luogo, noto il moto e la reazione da parte delle cellule tumorali in presenza di un sistema immunitario ben consolidato, è possibile sviluppare modelli predittivi utili ad eventuali pazienti affetti da cancro.

Inoltre, le ricerche in questo settore possono essere sfruttate durante i test su diverse tipologie di farmaci chemioterapici.

Alla base delle dinamiche cellulari osservate, vi è la chemiotassi, ovvero il moto direzionale delle cellule guidato dal segnale chimico. La chemiotassi, infatti, è un fenomeno che coinvolge molti processi biologici, tra cui la migrazione delle cellule in risposta a stimoli ricevuti, per questo ancora oggi è un aspetto che coinvolge molte ricerche, non solo nel campo medico, ma anche nel settore modellistico-matematico, con lo scopo di sostenere eventuali nuove scoperte.

L'analisi qualitativa sviluppata per il modello di *Keller-Segel* mostra un accordo tra la distribuzione asintotica assunta dalle cellule immunitarie ottenuta teoricamente e il risultato rinvenuto sperimentalmente (**Fig. 16**), nonostante le numerose semplificazioni introdotte affinché fosse avanzato uno studio numerico.

Tramite l'uso di tale modello è stato possibile simulare il comportamento delle cellule immunitarie in presenza di cellule tumorali. In particolar modo, come la variazione della sensibilità chemiotattica possa influire sulla presenza delle cellule immunitarie e dunque sul loro operato.

Con una $\chi(\varphi)$ costante, si è osservato come il flusso evolutivo immunitario non risentisse della sostanza chimica prodotta dalle cellule immunitarie, a causa degli elevanti gradienti del fattore assunti nei micro-canali; l'effetto attrattivo della chemochina è visibile con l'introduzione di una sensibilità più complessa e dipendente da φ stesso, che compensa valori del gradiente maggiori.

Riproducendo gli esperimenti effettuati in laboratorio, i due differenti scenari mostrati evidenziano un comportamento affine a quanto osservato sperimentalmente, per entrambe le categorie cellulari introdotte nel chip.

Gli aggregati tumorali presentati nel loro stadio primitivo figurano particolarmente dannosi, infatti questi diffondono velocemente nello spazio a loro disposizione e sono in grado di evitare l'attività delle cellule immunitarie. Dunque, in questo particolare scenario è evidente la pericolosità alla quale i pazienti affetti da cancro sono esposti.

Nota la riproducibilità del fenomeno, con un trattamento preventivo, quale l'utilizzo di un farmaco chemioterapico, l'attività tumorale è drasticamente ridotta, a fronte dell'operato immunitario, in grado di riconoscere e danneggiare le cellule maligne.

In definitiva, lo scenario trattato sperimentalmente apparirebbe come la soluzione al grande problema, ma la semplicità con la quale è stata rappresentata la patologia, non corrisponde alla complessa struttura assunta nella realtà. Dunque molti sono ancora i punti interrogativi alla quale la biologia e la matematica devono ancora rispondere.

Bibliografia

- [1] Braun, Elishan Christian, Gabriella Bretti, and Roberto Natalini. "Mass-preserving approximation of a chemotaxis multi-domain transmission model for microfluidic chips." *Mathematics* 9.6 (2021): 688.
- [2] Sherratt, Jonathan A. "Chemotaxis and chemokinesis in eukaryotic cells: the Keller-Segel equations as an approximation to a detailed model." *Bulletin of Mathematical Biology* 56.1 (1994): 129-146.
- [3] Low, L. A., Mummery, C., Berridge, B. R., Austin, C. P., Tagle, D. A. (2020). *Organs-on-chips: Into the next decade.* *Nature Reviews Drug Discovery*, 1-17.
- [4] Mosig, Alexander, Janna Nawroth, and Peter Loskill. "Organs-on-a-Chip: Neue Perspektiven in der Medikamentenentwicklung und Personalisierten Medizin." *Deutsche Zeitschrift für Klinische Forschung* 1 (2017): 7-14.
- [5] Wu, Qirui, et al. "Organ-on-a-chip: Recent breakthroughs and future prospects." *Biomedical engineering online* 19 (2020): 1-19.
- [6] Wlodkowic, Donald, and Jonathan M. Cooper. "Tumors on chips: oncology meets microfluidics." *Current opinion in chemical biology* 14.5 (2010): 556-567.
- [7] Vacchelli, Erika, et al. "Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1." *Science* 350.6263 (2015): 972-978.
- [8] Lapidus, I. Richard, and Ralph Schiller. "Model for the chemotactic response of a bacterial population." *Biophysical journal* 16.7 (1976): 779-789.
- [9] Murray, James D. *Mathematical biology II: Spatial models and biomedical applications.* Vol. 3. New York: Springer, 2001.
- [10] Maulana, Tengku Ibrahim, et al. "Immunocompetent cancer-on-chip models to assess immuno-oncology therapy." *Advanced Drug Delivery Reviews* 173 (2021): 281-305.
- [11] Biselli, Elena, et al. "Organs on chip approach: a tool to evaluate cancer-immune cells interactions." *Scientific reports* 7.1 (2017): 12737.
- [12] Waldman, Alex D., Jill M. Fritz, and Michael J. Lenardo. "A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice." *Nature Reviews Immunology* 20.11 (2020): 651-668.
- [13] Lowengrub, John S., et al. "Nonlinear modelling of cancer: bridging the gap between cells and tumours." *Nonlinearity* 23.1 (2009): R1.

- [14] Folkman, Judah, and Mark Hochberg. "Self-regulation of growth in three dimensions." *The Journal of experimental medicine* 138.4 (1973): 745-753.
- [15] Wang, Qi, Jingda Yan, and Chunyi Gai. "Qualitative analysis of stationary Keller–Segel chemotaxis models with logistic growth." *Zeitschrift für angewandte Mathematik und Physik* 67.3 (2016): 51.
- [16] Checcoli, Andrea, et al. "Dynamical Boolean Modeling of Immunogenic Cell Death." *Frontiers in Physiology* 11 (2020): 590479.
- [17] Agliari, Elena, et al. "Cancer-driven dynamics of immune cells in a microfluidic environment." *Scientific reports* 4.1 (2014): 6639.