

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Matematica

Tesi di Laurea Magistrale

Modellazione matematica degli effetti dell'ipossia sul metabolismo cellulare e sull'acidosi in colture cellulari in vitro



Relatori

Prof.ssa Chiara Givero
Prof. Luigi Preziosi
Dott.ssa Patrizia Ferrante

Candidato

Lucia Filacchione

Anno Accademico 2022-2023

Indice

| | |
|--|----|
| Sommario | 2 |
| Introduzione | 4 |
| 1 Diffusione e assorbimento di ossigeno in ambiente controllato | 6 |
| 1.1 Il processo biologico | 6 |
| 1.2 Il modello matematico e gli esperimenti in vitro | 7 |
| 1.2.1 Esperimento 1 | 8 |
| 1.2.2 Esperimento 2 | 10 |
| 1.3 Soluzioni analitiche | 13 |
| 1.3.1 Esperimento 1 | 13 |
| Caso stazionario 2D | 13 |
| Caso stazionario assialsimmetrico | 14 |
| Caso tempo-dipendente | 15 |
| 1.3.2 Esperimento 2 | 19 |
| Caso stazionario 2D | 19 |
| Caso stazionario assialsimmetrico | 20 |
| Espansioni asintotiche in coordinate cilindriche | 21 |
| Condizione di assorbimento nel limite di spessore dello strato cellulare nullo | 24 |
| 1.4 Simulazioni e validazione numerica di alcune soluzioni analitiche | 27 |
| 2 Risposta cellulare all'ipossia e all'acidosi | 30 |
| 2.1 Il processo biologico | 30 |
| 2.2 Alcuni modelli in letteratura | 31 |
| 2.3 Il modello matematico | 31 |
| 2.4 Risultati numerici | 38 |
| 2.4.1 Analisi di sensitività al variare dei parametri | 43 |
| 2.4.2 Variazioni della concentrazione esterna di ossigeno | 46 |
| 2.4.3 Esperimento 2 | 48 |
| 3 Influenza dell'ipossia sul metabolismo cellulare | 52 |
| 3.1 Il processo biologico | 52 |
| 3.2 Alcuni modelli in letteratura | 55 |
| 3.3 Il modello matematico | 56 |
| 3.4 Simulazioni e risultati numerici | 61 |
| Conclusioni e possibili sviluppi futuri | 67 |

Sommario

La carenza di ossigeno, un elemento essenziale per diversi processi biologici, prende il nome di ipossia e può avere gravi conseguenze sulle funzioni cellulari. Le cellule di un organismo sono in grado di percepire lo stato ipossico e mettere in atto diversi meccanismi adattativi, tra cui i principali coinvolgono i fattori inducibili dall'ipossia, denominati HIF, che regolano l'espressione di un vasto gruppo di geni.

Il presente lavoro ha lo scopo di modellare dal punto di vista matematico l'effetto dell'assenza di ossigeno e della distribuzione di pH sulla concentrazione di HIF e le successive conseguenze sul metabolismo cellulare e sull'acidosi. I modelli matematici sviluppati mirano a riprodurre due esperimenti in vitro, presenti in letteratura, in cui viene indotto uno stato ipossico in uno strato cellulare tumorale in due setting differenti. Il sistema proposto riproduce la dinamica della concentrazione di ossigeno tramite un'equazione di diffusione e reazione, per la quale si ricavano delle soluzioni analitiche nei due domini sperimentali. Poi, tramite l'accoppiamento con un sistema di due equazioni alle derivate ordinarie, è possibile descrivere l'evoluzione spazio-temporale della concentrazione del fattore HIF in ipossia, sotto l'influenza non solo dell'ossigeno e degli enzimi che interagiscono con HIF, ma anche dell'acidosi dell'ambiente cellulare. In un secondo momento, si propone un'estensione del precedente sistema per modellare le conseguenze dell'espressione anomala di HIF sui principali metaboliti della cellula e sul pH, in modo da considerare sia l'effetto dell'acidosi sulla concentrazione di HIF, sia, viceversa, l'influenza del fattore HIF sul pH. Il modello e i parametri coinvolti sono stati dedotti a partire da vari studi sperimentali e da numerosi modelli matematici sviluppati negli ultimi anni, i quali però, nella maggior parte dei casi, non considerano il legame tra concentrazione di fattore HIF, dei principali metaboliti delle cellule e dell'acidosi. Pertanto, dopo la descrizione di ciascun sistema di equazioni, si ricavano i risultati numerici e si confrontano qualitativamente con i dati e i modelli disponibili in letteratura. In entrambi i setting sperimentali, la concentrazione di ossigeno decresce notevolmente lontano dalla sorgente esterna dello stesso, coerentemente con quanto ottenuto anche dagli esperimenti in vitro. Invece, per il fattore HIF, si ottiene un profilo di concentrazione avente un massimo, il quale, a causa dell'azione combinata di ipossia e pH, non si registra nella regione maggiormente ipossica, ma nella zona prossima al bordo esterno. Si propone, inoltre, un'analisi di sensitività al variare dei parametri del modello e un possibile approccio analitico per il calcolo del valore dell'ascissa in cui la concentrazione di HIF raggiunge il massimo. I risultati ottenuti dai sistemi di equazioni sono coerenti con quelli presenti in letteratura e rispecchiano il fenomeno fisico coinvolto. In particolare, l'anello di espressione di HIF si ottiene se si considera una relazione, presa

dalla letteratura, O_2 -indipendente per la regolazione di HIF, mentre non risulta dal solo modello metabolico. Inoltre, il modello matematico potrebbe essere esteso ulteriormente, includendo sia altri fattori rilevanti nella dinamica di HIF sia ulteriori componenti che intervengono nel metabolismo delle cellule, come ad esempio i sistemi tampone del pH cellulare.

Introduzione

L'ossigeno è un reagente necessario per diverse biotrasformazioni ed è un elemento fondamentale per numerosi processi biologici e per il metabolismo aerobico cellulare, attraverso il quale l'organismo produce energia. La carenza di ossigeno, in termini di concentrazione e pressione all'interno dei tessuti cellulari, prende il nome di ipossia e può avere conseguenze gravi sulle funzioni delle cellule e sulla sopravvivenza delle stesse. In generale, l'ipossia può essere considerata un indice patologico, dal momento che si presenta insieme a numerose problematiche [1], tra cui infiammazioni, insufficienza vascolare, edema tissutale, malattie cardiovascolari e tumori.

A livello cellulare, l'organismo è in grado di percepire lo stato ipossico e mettere in atto diversi meccanismi adattativi, tra cui i principali coinvolgono i fattori inducibili dall'ipossia, che sono chiamati HIF. Questi regolano l'espressione di un vasto gruppo di geni, che controllano numerosi processi biologici, ad esempio la sopravvivenza cellulare, la glicolisi, l'angiogenesi e anche l'invasione e la formazione di metastasi. La formazione di regioni ipossiche può avvenire, ad esempio, nel caso tumorale, a seguito di una rapida proliferazione delle cellule in una regione a scarsa perfusione. L'esaurimento della disponibilità di ossigeno induce una risposta adattativa da parte del tessuto attraverso fattori angiogenetici, come il VEGF, che stimolano la produzione di nuovi vasi. Altri fattori genetici indotti da HIF sono in grado di aumentare i livelli di diversi enzimi glicolitici, che provocano quindi un aumento della velocità del processo di glicolisi, con cui la cellula metabolizza il glucosio. Oltre ad influenzare l'espressione genica, l'ipossia prolungata ha conseguenze anche sul metabolismo delle cellule e sul pH dell'ambiente cellulare. Infatti, in condizioni di ipossia, la cellula non è in grado di svolgere il processo metabolico aerobico, ma può solo passare a quello anaerobico, un meccanismo alternativo meno efficiente, che ha come reagente il solo glucosio, anche in assenza di ossigeno. In questo modo, aumenta la domanda di glucosio e, proporzionalmente al livello di ipossia, incrementa anche la produzione di acidi, in particolare acido lattico, che rendono l'ambiente più acido rispetto al pH fisiologico cellulare. Variazioni anche minime di pH, possono avere grandi conseguenze a livello fisiologico e compromettere diverse funzioni cellulari, come la produzione di energia, la sintesi proteica e la proliferazione [2], e innescare la necrosi delle cellule, come si verifica ad esempio nel nucleo di masse tumorali avascolari. Inoltre, diversi studi, come quello di Semenza [3] e quello di Filatova et al. [4], mettono in evidenza che un'elevata espressione di HIF e un ambiente acido stimolano l'invasione da parte delle cellule tumorali, la formazione di metastasi e promuovono un fenotipo cancerogeno nelle cellule staminali responsabili della progressione tumorale.

A causa del coinvolgimento del fattore HIF in numerosi processi di interesse biologico e farmacologico, negli ultimi anni sono stati effettuati diversi esperimenti in vitro su linee cellulari differenti, per caratterizzare l'espressione del fattore HIF. Spesso le cellule utilizzate sono di tipo tumorale, che, a differenza di quelle sane, risultano più interessanti dal punto di vista clinico e possono trovarsi più spesso in condizioni di ipossia, come nel caso della proliferazione avascolare descritta in precedenza. Con il presente lavoro si mira a riprodurre alcuni risultati ottenuti recentemente dagli esperimenti in vitro di Honda et al. [5], attraverso un modello matematico, con cui si riproducono gli effetti dell'assenza di ossigeno e della distribuzione di pH sul fattore HIF. Infatti, studiare le implicazioni dell'ipossia dal punto di vista matematico può risultare interessante anche per eventuali sviluppi preclinici e farmacologici, dal momento che intervenire sulla rete di reazioni e segnali che coinvolge il fattore HIF potrebbe costituire la chiave per nuovi sviluppi nella terapia contro il cancro, anche se ancora in fase di studio [6].

Capitolo 1

Diffusione e assorbimento di ossigeno in ambiente controllato

L'ossigeno nei tessuti riveste un ruolo centrale per la sopravvivenza e il corretto funzionamento delle cellule. Esso, infatti, è necessario per la produzione di energia nella cellula e se la sua concentrazione è insufficiente, si possono verificare delle alterazioni del ciclo cellulare o addirittura la necrosi dei tessuti, con gravissime conseguenze biologiche. Per questo motivo, l'organismo ha sviluppato un sistema complesso ed efficiente per la diffusione dell'ossigeno in tutte le cellule e una serie di meccanismi di controllo per monitorare che i livelli di ossigeno siano adeguati, individuare le zone di ipossia e porvi rimedio. È, quindi, interessante studiare come si diffonde e distribuisce l'ossigeno in un certo dominio cellulare, date delle condizioni iniziali e al contorno, per capire quali siano le regioni più a rischio di ipossia. Inoltre, la conoscenza delle proprietà diffusive dell'ossigeno risulta fondamentale anche per lo sviluppo dell'ingegneria tissutale, con cui si mira a riprodurre tessuti biologici sempre più funzionali [7].

1.1 Il processo biologico

L'ipossia può avere diverse cause e può caratterizzare varie tipologie di tessuti biologici. Come è descritto più nel dettaglio in [8], essa può derivare da tre fenomeni principali. Il primo consiste in insufficiente concentrazione di ossigeno all'interno delle arterie, che dunque non riescono a fornire il giusto apporto ai tessuti. Inoltre, può essere causata da un trasporto inefficiente di ossigeno dai capillari ai tessuti, che è strettamente legato all'attività cardiaca, o ancora da un errato assorbimento e utilizzo dell'ossigeno da parte dell'organismo. In alternativa, si possono generare delle zone ipossiche a seguito della formazione di masse tumorali avascolari, infatti la carenza di ossigeno costituisce uno degli aspetti più studiati degli ambienti microtumoral solidi. Dunque, l'ipossia, intesa come

conseguenza dello squilibrio tra domanda e disponibilità di ossigeno, può essere sia temporanea che cronica. I gradienti di ossigeno nei tessuti biologici influenzano direttamente l'espressione genica, che regola diverse se non tutte le funzioni cellulari. In questo modo, le cellule sono in grado di rispondere alla mancanza di ossigeno adattando all'ipossia diversi meccanismi fisiologici, come il metabolismo energetico cellulare, l'assorbimento di nutrienti, la respirazione mitocondriale e la sintesi di proteine.

Il processo microscopico con cui l'ossigeno attraversa la membrana plasmatica e raggiunge i mitocondri, dove avviene poi la fosforilazione ossidativa, è ancora oggetto di studio e non verrà modellato matematicamente nel presente lavoro. Invece, a livello macroscopico, le molecole di O_2 sono trasportate per diffusione a partire da una sorgente di ossigeno esterna alla cellula, che, in vivo, è costituita dai capillari, mentre negli esperimenti in vitro può essere identificata con l'ambiente esterno. Dunque, nelle colture cellulari in vitro, la concentrazione di ossigeno è determinata dal bilanciamento tra diffusione passiva di ossigeno proveniente dall'ambiente circostante e consumo dello stesso da parte delle cellule per la produzione di energia [9].

1.2 Il modello matematico e gli esperimenti in vitro

Per modellare matematicamente gli effetti dell'ipossia, si è scelto di schematizzare la dinamica dell'ossigeno non alla scala microscopica, ma dal punto di vista macroscopico, andando a descrivere l'evoluzione spazio-temporale della concentrazione di ossigeno $c(x, t)$. Quindi, risultano rilevanti ai fini della modellazione il processo di diffusione passiva dell'ossigeno nell'ambiente extracellulare, nelle cellule e l'assorbimento da parte delle stesse, per la produzione di energia attraverso il metabolismo. La precedente dinamica si può riprodurre attraverso un'equazione di reazione e diffusione alle derivate parziali, in cui la componente diffusiva è caratterizzata dal coefficiente di diffusione D , mentre quella di consumo da parte delle cellule segue un tasso di assorbimento δ . Se si ipotizza che il tessuto sia sufficientemente omogeneo e non presenti strutture con direzioni preferenziali (anisotropia), si può assumere che la diffusione di ossigeno nell'ambiente sia omogenea, cioè che D sia costante, mentre si suppone che l'assorbimento sia proporzionale alla concentrazione stessa di O_2 in ogni punto. La dinamica appena descritta è riprodotta dalla seguente equazione

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = D\nabla^2 c(x, t) - \delta c(x, t) \quad x \in \Omega, \quad t > 0 \quad (1.1)$$

dove Ω è il dominio spaziale in cui si analizza il problema, che verrà scelto sulla base di alcuni esperimenti in vitro selezionati tra quelli presenti in letteratura. Il primo termine a secondo membro simula la diffusione dell'ossigeno, mentre il secondo termine riproduce l'assorbimento da parte delle cellule. In questa sede, si è scelto di studiare l'equazione in due setting differenti, che riproducono due diversi esperimenti in vitro, descritti nel dettaglio in [5] e [10], dove non c'è il trasporto di ossigeno da parte di un fluido. Se, invece, si considerano modelli in vivo, si deve tenere conto del trasporto di ossigeno da parte del sangue nei tessuti.

1.2.1 Esperimento 1

In primo luogo, è stato selezionato il dominio spaziale Ω dell'esperimento su cellule in vitro in ipossia, effettuato da Honda et al. [5], che riproduce una condizione di ipoperfusione indotta su diversi tipi di cellule, tra cui cellule renali HK-2, cellule cancerogene cervicali HeLa e cellule embrionali renali HEK293. Inizialmente esse sono disposte sul fondo di un vetrino dal diametro di 27 mm, in un numero circa pari a $5 \cdot 10^5$ cellule per vetrino. Poi la massa cellulare viene trattata per permettere la misurazione dei risultati e l'ipossia viene indotta in due maniere differenti. Secondo la procedura tradizionale, rappresentata in Figura 1.1a, si pone un vetrino dal diametro di 15 mm a copertura dell'intero strato, impedendo il passaggio di ossigeno. Tuttavia, spesso, nel rimuovere il vetrino le cellule si staccano, quindi è preferibile adottare una procedura alternativa. Come riportato in Figura 1.1b, le cellule si dispongono sopra al vetrino circolare, che nel caso precedente costituiva la copertura, il quale dopo un giorno viene rimosso insieme alle cellule sovrastanti e rovesciato sul fondo di un altro disco.

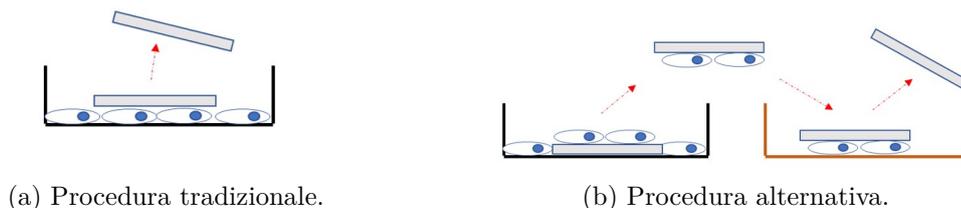


Figura 1.1: Rappresentazione delle due modalità con cui viene indotta l'ipossia in uno strato cellulare contenuto tra due vetrini circolari in [5].

A valle dell'esperimento, si rileva la presenza di un gradiente di ossigeno attraverso la misurazione dell'intensità di fosforescenza. Si ottiene una concentrazione di O_2 massima ai bordi dello strato cellulare, dove le cellule sono a contatto con l'ambiente esterno, e minima al centro del disco.

In prima battuta, per studiare l'equazione (1.1) di reazione e diffusione nel dominio sperimentale di Honda [5], rappresentato in Figura 1.2b, si può considerare il dominio rettangolare Ω , mostrato in Figura 1.2c, così da studiare in maniera più agevole il problema analitico. Il rettangolo coincide con la sezione dalla geometria 3D, evidenziata nella Figura 1.2b, dalla quale, per rotazione attorno all'asse verticale a , si ottiene il dominio cilindrico di partenza. In base a quanto riportato in [5], il rettangolo ha una base di lunghezza $L = 7.5$ mm, pari al raggio del disco, e una altezza h , che viene posta della stessa dimensione del diametro di una cellula, quindi circa $h = 10 \mu\text{m}$.

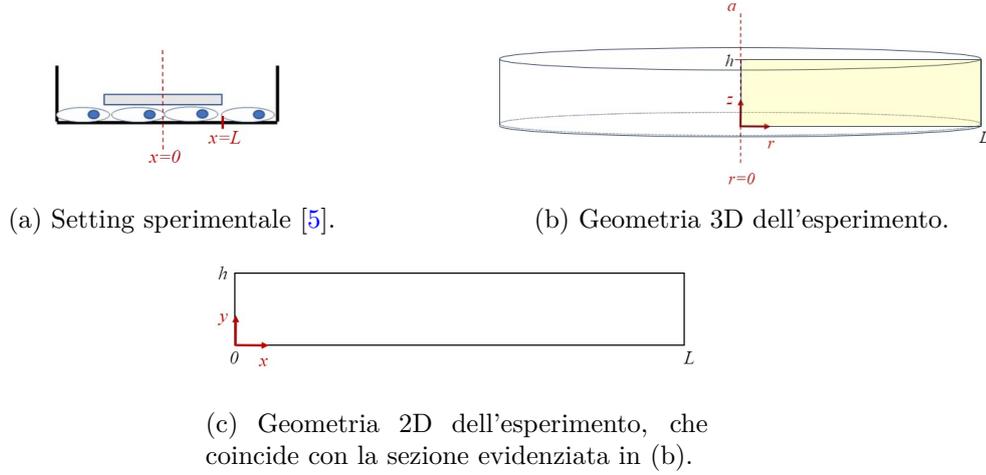


Figura 1.2: Rappresentazione del dominio matematico a partire dall'esperimento in vitro effettuato in [5].

Per riprodurre il gradiente di ossigeno ottenuto in vitro, si considera il seguente sistema, che include l'equazione (1.1) di diffusione e reazione per la concentrazione di ossigeno, la condizione iniziale nel dominio rettangolare $\Omega = (0, L) \times (0, h)$ e le condizioni al bordo relative al setting dell'esperimento di Honda [5]

$$\begin{cases} \frac{\partial c}{\partial t}(x, y, t) = D\nabla^2 c(x, y, t) - \delta c(x, y, t) & (x, y) \in \Omega, \quad t > 0 \\ c(L, y, t) = C_0 & y \in [0, h], \quad t > 0 \\ \frac{\partial c}{\partial x}(0, y, t) = 0 & y \in [0, h], \quad t > 0 \\ \frac{\partial c}{\partial y}(x, 0, t) = 0 & x \in [0, L], \quad t > 0 \\ \frac{\partial c}{\partial y}(x, L, t) = 0 & x \in [0, L], \quad t > 0 \\ c(x, y, 0) = C_0 & (x, y) \in \Omega \end{cases} \quad (1.2)$$

dove la variabile C_0 indica la concentrazione di ossigeno nell'ambiente esterno, che in condizioni di normossia è circa pari al 21%.

Per ottenere il dominio effettivo dell'esperimento, rappresentato in Figura 1.3, si può estendere il precedente caso a quello tridimensionale, esprimendo il sistema in coordinate cilindriche (r, θ, z) , nella seguente maniera

$$\left\{ \begin{array}{l}
 \frac{\partial c}{\partial t}(r, \theta, z, t) = D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} (r, \theta, z, t) \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 c}{\partial \theta^2} (r, \theta, z, t) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} (r, \theta, z, t) \right] - \delta c(r, \theta, z, t) \\
 c(L, \theta, z, t) = C_0 \\
 \frac{\partial c}{\partial r}(0, \theta, z, t) = 0 \\
 \frac{\partial c}{\partial z}(r, \theta, 0, t) = 0 \\
 \frac{\partial c}{\partial z}(r, \theta, h, t) = 0 \\
 c(r, \theta, z, 0) = C_0
 \end{array} \right. \quad \begin{array}{l}
 (r, \theta, z) \in \Omega \times (0, 2\pi), \quad t > 0 \\
 (\theta, z) \in [0, 2\pi] \times [0, h], \quad t > 0 \\
 (\theta, z) \in [0, 2\pi] \times [0, h], \quad t > 0 \\
 (r, \theta) \in [0, L] \times [0, 2\pi], \quad t > 0 \\
 (r, \theta) \in [0, L] \times [0, 2\pi], \quad t > 0 \\
 (r, \theta, z) \in \Omega
 \end{array} \quad (1.3)$$

Per la simmetria del problema, la concentrazione di ossigeno non dipende dall'angolo θ , quindi il precedente sistema si può semplificare in

$$\left\{ \begin{array}{l}
 \frac{\partial c}{\partial t}(r, z, t) = D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} (r, z, t) \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} (r, z, t) \right] - \delta c(r, z, t) \\
 c(L, z, t) = C_0 \\
 \frac{\partial c}{\partial r}(0, z, t) = 0 \\
 \frac{\partial c}{\partial z}(r, 0, t) = 0 \\
 \frac{\partial c}{\partial z}(r, h, t) = 0 \\
 c(r, z, 0) = C_0
 \end{array} \right. \quad \begin{array}{l}
 (r, z) \in \Omega, \quad t > 0 \\
 z \in [0, h], \quad t > 0 \\
 z \in [0, h], \quad t > 0 \\
 r \in [0, L], \quad t > 0 \\
 r \in [0, L], \quad t > 0 \\
 (r, z) \in \Omega
 \end{array} \quad (1.4)$$

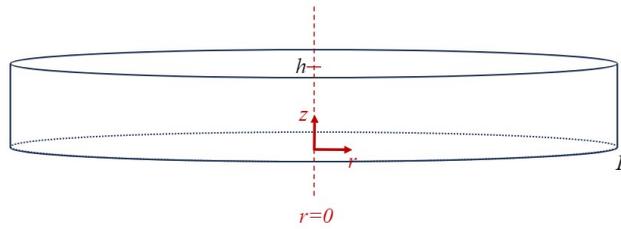
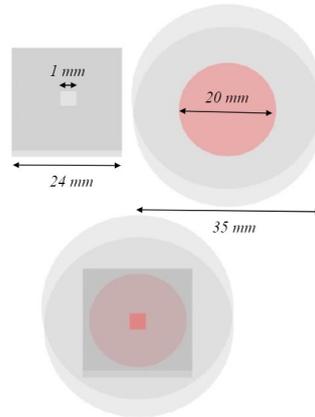


Figura 1.3: Dominio cilindrico dell'esperimento in vitro in [5].

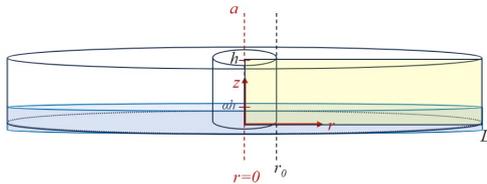
1.2.2 Esperimento 2

Negli esperimenti in vitro effettuati da Arocena et al. [10], il setting è diverso e le cellule utilizzate sono quelle tumorali prostatiche LNCaP. Si realizza una coltura cellulare in un

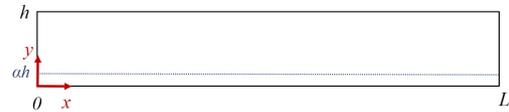
pozzetto di 20 mm di diametro e 1 mm di spessore, appoggiato su un disco dal diametro di 35 mm. Il pozzetto viene poi coperto da un vetrino di 24 mm di diametro, avente al centro un foro quadrato largo 1 mm. Dal momento che lo spessore medio delle cellule sul fondo è dell'ordine dei micrometri, quindi molto inferiore al millimetro, le cellule occupano solo uno strato sottile sul fondo del vetrino e non tutto lo spessore tra i due dischi, come accadeva nel precedente esperimento. Inoltre, poiché il diametro della copertura è maggiore di quello del pozzetto stesso, il foro quadrato è l'unica fonte di ossigeno per le cellule all'interno, mentre, nel setting precedente di Honda [5], tutto il bordo esterno era a contatto con l'ossigeno. In termini geometrici, lo spessore complessivo del vetrino rimane h , mentre l'assorbimento dell'ossigeno avviene solo in uno strato di altezza αh , con $\alpha < 1$, cioè dove sono presenti le cellule. Nella rappresentazione matematica del setting sperimentale, il foro centrale quadrato è stato approssimato con un foro circolare, in modo da agevolare lo studio in coordinate cilindriche. Anche in questo caso, si considera inizialmente un dominio rettangolare, rappresentato in Figura 1.4c e ottenuto a partire da una sezione della geometria assialsimmetrica di partenza, come si evidenzia nella Figura 1.4b. Come nel precedente caso, per rotazione del rettangolo attorno all'asse verticale a , si riottiene il dominio assialsimmetrico di partenza.



(a) Rappresentazione dei vetrini utilizzati per la coltura cellulare.



(b) Geometria 3D dell'esperimento.



(c) Geometria 2D dell'esperimento, dove $L = 10$ mm, $h = 1$ mm e $\alpha < 1$.

Figura 1.4: Rappresentazione del dominio matematico a partire dall'esperimento in vitro effettuato in [10].

In questo caso, nell'equazione di diffusione e reazione, il termine di degradazione coincide con quello del caso precedente $\delta c(x, y, t)$, solo dove è presente lo strato cellulare, mentre è nullo nel resto del dominio. Quindi, per considerare il problema in tutto il dominio, si considera una degradazione proporzionale alla funzione caratteristica H_{Ω_c} , che identifica lo strato cellulare sul fondo e una condizione di continuità per la concentrazione di ossigeno all'interfaccia tra lo strato cellulare e il liquido circostante. Il termine diffusivo, invece, resta invariato rispetto al caso precedente e il sistema che descrive la dinamica della concentrazione di ossigeno è dato da

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{\partial c}{\partial t}(x, y, t) = D\nabla^2 c(x, y, t) - \delta H_{\Omega_c}(x, y)c(x, y, t) & (x, y) \in \Omega, \quad t > 0 \\ c(0, y, t) = C_0 & y \in [0, h], \quad t > 0 \\ \frac{\partial c}{\partial x}(L, y, t) = 0 & y \in [0, h], \quad t > 0 \\ \frac{\partial c}{\partial y}(x, 0, t) = 0 & x \in [0, L], \quad t > 0 \\ \frac{\partial c}{\partial y}(x, h, t) = 0 & x \in [0, L], \quad t > 0 \\ c(x, y, 0) = C_0 & (x, y) \in \Omega \end{array} \right. \quad (1.5)$$

dove $\Omega_c = [0, L] \times [0, \alpha h]$ è il dominio occupato dalle cellule e

$$H_{\Omega_c}(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{se } (x, y) \in \Omega_c \\ 0 & \text{altrimenti} \end{cases}$$

L'analisi effettuata può essere estesa al caso tridimensionale se si passa alle coordinate cilindriche (r, θ, z) e si guarda al problema nel dominio cilindrico rappresentato nella Figura 1.5. Per risolvere il problema analiticamente, è stata approssimata la condizione al bordo del problema originale. Nell'esperimento [10], il bordo a contatto con l'esterno è quello orizzontale superiore, compreso tra le coordinate radiali 0 e r_0 , mentre in questo caso si impone che il lato del dominio a contatto con l'ossigeno esterno sia quello verticale in corrispondenza della coordinata radiale $r = r_0$, dove $r_0 = 0.5$ mm, cioè metà dell'ampiezza del foro centrale dal quale entra ossigeno. Se, per la simmetria del problema, si trascura

la dipendenza dall'angolo θ , si ricava il seguente sistema

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial c}{\partial t}(r, z, t) = D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} (r, z, t) \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} (r, z, t) \right] - \delta H_{\Omega_c}(r, z) c(r, z, t) \quad (r, z) \in (r_0, L) \times (0, h), \quad t > 0 \\ c(r_0, z, t) = C_0 \quad z \in [0, h], \quad t > 0 \\ \frac{\partial c}{\partial r}(L, z, t) = 0 \quad z \in [0, h], \quad t > 0 \\ \frac{\partial c}{\partial z}(r, 0, t) = 0 \quad r \in [r_0, L], \quad t > 0 \\ \frac{\partial c}{\partial z}(r, h, t) = 0 \quad r \in [r_0, L], \quad t > 0 \\ c(r, z, 0) = C_0 \quad (r, z) \in [r_0, L] \times [0, h] \end{array} \right. \quad (1.6)$$

dove

$$H_{\Omega_c}(r, z) = \begin{cases} 1 & \text{se } (r, z) \in \Omega_c \\ 0 & \text{altrimenti} \end{cases}$$

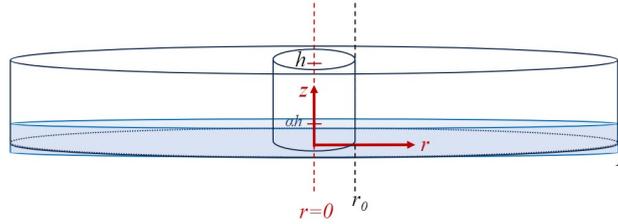


Figura 1.5: Dominio cilindrico dell'esperimento in vitro in [10].

1.3 Soluzioni analitiche

1.3.1 Esperimento 1

Caso stazionario 2D

Per trovare la soluzione stazionaria del problema (1.2) si deve imporre che la concentrazione di ossigeno non vari in tempo, cioè

$$\frac{\partial c}{\partial t}(x, y, t) = D \nabla^2 c(x, y, t) - \delta c(x, y, t) = 0 \quad (1.7)$$

da cui, esplicitando l'operatore laplaciano, segue l'equazione

$$D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}(x, y) + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2}(x, y) \right) - \delta c(x, y) = 0 \quad (1.8)$$

Per la simmetria delle condizioni al bordo di flusso verticale nel sistema (1.2), la soluzione non dipende dalla coordinata verticale, quindi si può considerare il problema

$$\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}(x) - \frac{\delta}{D}c(x) = 0 \quad (1.9)$$

che ha soluzioni della forma

$$c(x) = Ae^{\lambda_1 x} + Be^{\lambda_2 x}$$

dove λ_1 e λ_2 sono gli autovalori che devono soddisfare l'equazione $\lambda^2 - \frac{\delta}{D} = 0$, da cui $\lambda_P = \pm\sqrt{\frac{\delta}{D}}$ e $\sqrt{\frac{\delta}{D}}$ è la profondità di diffusione.

Le condizioni al bordo associate all'equazione (1.9) derivano direttamente dal sistema di partenza (1.2) e sono $c(x = L) = C_0$, cioè una concentrazione fissata a contatto con l'ambiente esterno, e $\frac{\partial c}{\partial x}(x = 0) = 0$, cioè una condizione di flusso nullo lungo il bordo interno. Pertanto, la soluzione analitica stazionaria del problema bidimensionale in coordinate cartesiane è la seguente

$$c(x) = C_0 \frac{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}x} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}x}}{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L}} \quad (1.10)$$

Caso stazionario assialsimmetrico

La soluzione del problema stazionario in coordinate cilindriche si ricava a partire dal sistema (1.4), imponendo che le variazioni temporali di concentrazione di ossigeno siano nulle, cioè

$$\frac{\partial c}{\partial t}(r, z, t) = D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r}(r, z, t) \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2}(r, z, t) \right] - \delta c(r, z, t) = 0$$

Come nel caso bidimensionale, la simmetria del problema lungo la verticale permette di trascurare le variazioni di concentrazione lungo z , quindi si può considerare l'equazione

$$\begin{aligned} \frac{D}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{dc}{dr}(r) \right) - \delta c(r) &= 0 \\ \frac{1}{r} \frac{dc}{dr}(r) + \frac{d^2 c}{dr^2}(r) - \frac{\delta}{D}c(r) &= 0 \end{aligned} \quad (1.11)$$

A questo punto, si può assumere che a concentrazione sia già adimensionalizzata rispetto alla concentrazione esterna C_0 e adimensionalizzare la coordinata radiale, scegliendo come lunghezza caratteristica la profondità di diffusione $\sqrt{\frac{D}{\delta}}$. Così si ricava la coordinata adimensionale $\tilde{r} = \frac{r}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}$, rispetto alla quale si ottiene l'equazione di Bessel canonica

$$\tilde{r}^2 \frac{d^2 c}{d\tilde{r}^2} + \tilde{r} \frac{dc}{d\tilde{r}} - \tilde{r}^2 c = 0 \quad (1.12)$$

la cui soluzione è

$$c(\tilde{r}) = AI_0(\tilde{r}) + BK_0(\tilde{r}) \quad (1.13)$$

dove I_0 e K_0 sono rispettivamente le funzioni di Bessel modificate di ordine zero del primo e del secondo tipo. Le condizioni al bordo per l'equazione (1.12) derivano dal sistema di partenza (1.4), dove si deve riscalarare opportunamente la variabile radiale. La condizione di Dirichlet lungo il bordo del dominio a contatto con l'ambiente esterno, consente di ricavare la costante A come segue

$$c\left(\tilde{r} = \frac{L}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right) = C_0 \quad \Rightarrow \quad AI_0\left(\frac{L}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right) = C_0 \quad \Rightarrow \quad A = \frac{C_0}{I_0\left(\frac{L}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)} \quad (1.14)$$

Invece dalla condizione di flusso nullo lungo il bordo interno si ricava la costante B nella seguente maniera

$$\frac{dc}{d\tilde{r}}(\tilde{r} = 0) = 0 \quad \Rightarrow \quad AI_1(0) - BK_1(0) = 0 \quad \Rightarrow \quad B = 0 \quad (1.15)$$

Inserendo le costanti nell'equazione (1.13), si ottiene la soluzione stazionaria in coordinate cilindriche per il sistema (1.4)

$$c(\tilde{r}) = C_0 \frac{I_0(\tilde{r})}{I_0\left(\frac{L}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)} \quad \Rightarrow \quad c(r) = C_0 \frac{I_0\left(\frac{r}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)}{I_0\left(\frac{L}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)} \quad (1.16)$$

Caso tempo-dipendente

Si può ricavare una soluzione tempo-dipendente del problema bidimensionale attraverso il metodo della separazione delle variabili, sfruttando nuovamente l'indipendenza della soluzione dalla coordinata verticale. Per il caso cartesiano si risolve il seguente sistema nelle variabili t temporale e x orizzontale

$$\begin{cases} \frac{\partial c}{\partial t}(x, t) = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}(x, t) - \delta c(x, t) & x \in (0, L) \quad t \geq 0 \\ c(L, t) = C_0 \\ \frac{\partial c}{\partial x}(0, t) = 0 \\ c(x, 0) = C_0 \end{cases} \quad (1.17)$$

Per semplificare il problema, si può ipotizzare che la soluzione dipenda dalla variabile spaziale x e dal tempo t nella seguente maniera

$$c(x, t) = v(x) + w(x, t)$$

dove sia v sia w soddisfano separatamente il problema di partenza e le rispettive condizioni al bordo

$$\begin{cases} Dv''(x) - \delta v(x) = 0 \\ v'(0) = 0 \\ v(L) = C_0 \end{cases} \quad \begin{cases} \frac{\partial w}{\partial t}(x, t) = D \frac{\partial^2 w}{\partial x^2}(x, t) - \delta w(x, t) \\ \frac{\partial w}{\partial x}(0, t) = 0 \\ w(L, t) = 0 \\ w(x, 0) = C_0 \end{cases} \quad (1.18)$$

La soluzione del primo problema nella (1.18), come dedotto in precedenza per il caso stazionario, è del tipo

$$v(x) = Ae^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}x} + Be^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}x}$$

da cui imponendo le condizioni al bordo si ricava

$$v(x) = C_0 \frac{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}x} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}x}}{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L}} \quad (1.19)$$

Per il secondo problema nella (1.18), invece, si cerca una soluzione che sia della forma $w(x, t) = X(x)T(t)$, quindi si deduce l'equazione

$$\frac{1}{D} \frac{T'(t)}{T(t)} = \frac{X''(x)}{X(x)} - \frac{\delta}{D} = -\lambda \quad (1.20)$$

dove λ è una costante positiva. Si ricavano due equazioni disaccoppiate, una per la funzione $X(x)$ e una per $T(t)$. La prima consiste in

$$\frac{X''(x)}{X(x)} = \frac{\delta}{D} - \lambda = -p^2 \quad (1.21)$$

con $p > 0$, da risolvere con le condizioni al bordo omogenee

$$\begin{cases} \frac{\partial w}{\partial x}(0, t) = 0 \Rightarrow X'(0)T(t) = 0 \Rightarrow X'(0) = 0 \\ w(L, t) = 0 \Rightarrow X(L)T(t) = 0 \Rightarrow X(L) = 0 \end{cases}$$

La soluzione dell'equazione (1.21) è della forma $X(x) = C \cos(px) + D \sin(px)$, dove le costanti D e p si ricavano imponendo le condizioni omogenee al bordo

$$X'(0) = Dp = 0 \Rightarrow D = 0$$

$$X(L) = C \cos(pL) = 0 \Rightarrow pL = \frac{\pi}{2}(2n + 1) \quad n \geq 0$$

$$p_n = \frac{\pi(2n + 1)}{2L} \quad (1.22)$$

Dalla (1.22) combinata con la (1.21) risulta che $\lambda_n = \left(\frac{\pi(2n+1)}{2L}\right)^2 + \frac{\delta}{D}$. Si ricava, dunque, che la funzione spazio dipendente è della forma $X_n(x) = C_n \cos(p_n x)$. Quella temporale, invece, deve soddisfare l'equazione

$$\frac{1}{D} \frac{T'(t)}{T(t)} = -\lambda \quad (1.23)$$

quindi sarà del tipo $T_n(t) = E_n e^{-\lambda_n D t}$. Combinando le funzioni e sommando sul parametro n si ottiene la funzione (1.24) da combinare con $v(x)$ per ottenere la soluzione complessiva.

$$w(x, t) = \sum_{n=0}^{\infty} F_n e^{-\lambda_n D t} \cos(p_n x) \quad (1.24)$$

$$c(x, t) = v(x) + w(x, y) = C_0 \frac{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}x} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}x}}{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L}} + \sum_{n=0}^{\infty} F_n e^{-\lambda_n D t} \cos(p_n x) \quad (1.25)$$

A questo punto, imponendo la condizione iniziale si ottiene un'equazione da cui si possono ricavare i coefficienti F_n , riportati per esteso in (1.28) e (1.29).

$$c(x, 0) = C_0 = C_0 \frac{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}x} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}x}}{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L}} + \sum_{n=0}^{\infty} F_n \cos(p_n x) \quad (1.26)$$

$$C_0 \left(1 - \frac{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}x} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}x}}{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L}}\right) = F_0 + \sum_{n=1}^{\infty} F_n \cos(p_n x) \quad (1.27)$$

$$F_0 = \frac{1}{L} \int_0^L C_0 \left(1 - \frac{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}x} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}x}}{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L}}\right) dx = C_0 - \frac{C_0}{L} \sqrt{\frac{\delta}{D}} \left(\frac{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} - e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L}}{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L}}\right) \quad (1.28)$$

$$\begin{aligned} F_n &= \frac{2}{L} \int_0^L C_0 \left(1 - \frac{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}x} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}x}}{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L}}\right) \cos(p_n x) dx = \\ &= 2C_0 (-1)^n \left[\frac{4}{\pi(2n+1)} - \frac{p_n e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} (e^{2L\sqrt{\frac{\delta}{D}}} + 1)}{L\lambda_n (e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} - e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L})} \right] \end{aligned} \quad (1.29)$$

In coordinate cilindriche, sfruttando l'indipendenza della soluzione dalla verticale, il problema tempo-dipendente diventa

$$\begin{cases} \frac{\partial c}{\partial t}(r, t) = \frac{D}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{dc}{dr}(r, t) \right) - \delta c(r, t) & r \in (0, L) \quad t \geq 0 \\ c(L, t) = C_0 \\ \frac{\partial c}{\partial r}(0, t) = 0 \\ c(r, 0) = C_0 \end{cases} \quad (1.30)$$

Come nel caso bidimensionale, si può ipotizzare che la soluzione dipenda dalla variabile spaziale r e dal tempo nella seguente maniera

$$c(r, t) = u(r) + w(r, t)$$

dove sia u sia w soddisfano separatamente il problema di partenza. Quindi la prima funzione u è soluzione del sistema

$$\begin{cases} r^2 u''(r) + r u'(r) - \frac{\delta}{D} u(r) = 0 \\ u'(0) = 0 \quad u(L) = C_0 \end{cases} \quad (1.31)$$

Trattandosi di un'equazione analoga alla (1.11) del caso stazionario, la soluzione è data da

$$u(r) = C_0 \frac{I_0\left(\frac{r}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)}{I_0\left(\frac{L}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)} \quad (1.32)$$

L'altra funzione invece deve soddisfare il seguente sistema

$$\begin{cases} \frac{\partial w}{\partial t}(r, t) = \frac{D}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{dw}{dr}(r, t) \right) - \delta w(r, t) & r \in (0, L) \quad t \geq 0 \\ w(L, t) = 0 \\ \frac{\partial w}{\partial r}(0, t) = 0 \\ w(r, 0) = C_0 \end{cases} \quad (1.33)$$

Per risolverlo si può sfruttare il metodo della separazione delle variabili e imporre che la funzione w sia della forma $w(r, t) = R(r)T(t)$, per cui il problema diventa

$$\frac{1}{D} \frac{T'(t)}{T(t)} = \frac{1}{r} \frac{R'(r) + r R''(r)}{R(r)} - \frac{\delta}{D} = -\lambda \quad (1.34)$$

dove la funzione $R(r)$ si ricava come soluzione del sistema

$$\begin{cases} r^2 R''(r) + r R'(r) + (\lambda - \frac{\delta}{D}) r^2 R(r) = 0 \\ R'(0) = 0 \\ R(L) = 0 \end{cases} \quad (1.35)$$

Come già fatto in precedenza, se si riscalda la variabile radiale come $\tilde{r} = \frac{r}{\sqrt{\frac{D}{\lambda D - \delta}}}$, allora

la soluzione è quella canonica $R(\tilde{r}) = A J_0(\tilde{r}) + B Y_0(\tilde{r})$, dove J_0 e Y_0 sono le funzioni di Bessel di ordine 0 rispettivamente del primo e del secondo tipo. Dalle condizioni al bordo si ricava

$$R'(0) = 0 \Rightarrow B = 0 \quad R(L) = 0 \Rightarrow J_0\left(\frac{L}{\sqrt{\frac{D}{\lambda D - \delta}}}\right) = 0$$

cioè il parametro λ deve essere tale che $L/\sqrt{D/(\lambda D - \delta)}$ sia uno zero della funzione di Bessel di prima specie. Se α_n è la successione di zeri della funzione, allora $\lambda_n = \frac{\alpha_n^2}{L^2} + \frac{\delta}{D}$, da cui segue che

$$R_n(r) = A_n J_0\left(\frac{r}{\sqrt{\frac{D}{\lambda_n D - \delta}}}\right) = A_n J_0\left(\frac{\alpha_n}{L} r\right) \quad (1.36)$$

La funzione del tempo $T(t)$, invece, deve soddisfare

$$\frac{T'(t)}{T(t)} = -\lambda D \Rightarrow T_n(t) = C_n e^{-\lambda_n D t} \quad (1.37)$$

per cui la soluzione complessiva del sistema (1.33) è della forma

$$w(r, t) = \sum_{n=0}^{+\infty} D_n e^{-\lambda_n D t} J_0\left(\frac{\alpha_n}{L} r\right) \quad (1.38)$$

Pertanto, la concentrazione come somma di funzioni è data dall'espressione

$$c(r, t) = C_0 \frac{I_0\left(\frac{r}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)}{I_0\left(\frac{L}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)} + \sum_{n=0}^{+\infty} D_n e^{-\lambda_n D t} J_0\left(\frac{\alpha_n}{L} r\right) \quad (1.39)$$

Infine, la condizione iniziale non omogenea permette di ricavare le costanti D_n attraverso la seguente relazione

$$\begin{aligned} c(r, 0) = C_0 &= C_0 \frac{I_0\left(\frac{r}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)}{I_0\left(\frac{L}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)} + \sum_{n=0}^{+\infty} D_n J_0\left(\frac{\alpha_n}{L} r\right) \\ C_0 \left(1 - \frac{I_0\left(\frac{r}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)}{I_0\left(\frac{L}{\sqrt{\frac{D}{\delta}}}\right)}\right) &= D_0 + \sum_{n=1}^{+\infty} D_n J_0\left(\frac{\alpha_n}{L} r\right) \end{aligned} \quad (1.40)$$

1.3.2 Esperimento 2

Caso stazionario 2D

Per trovare la soluzione stazionaria del problema (1.5), si deve imporre che la concentrazione di ossigeno non vari in tempo, quindi esplicitando l'operatore laplaciano

$$D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}(x, y) + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2}(x, y) \right) - \delta H_{\Omega_c}(x, y) c(x, y) = 0 \quad (1.41)$$

La particolare conformazione geometrica per la quale $h \ll L$, consente di approssimare il problema originale trascurando le variazioni di concentrazione lungo la verticale. Quindi se si considera una concentrazione media verticale data da

$$\bar{c}(x) = \frac{1}{h} \int_0^h c(x, y) dy \quad (1.42)$$

allora si ottiene la seguente equazione

$$\frac{\partial^2 \bar{c}}{\partial x^2}(x) - \frac{\delta \alpha}{D} \bar{c}(x) = 0 \quad (1.43)$$

che ha una soluzione nota della forma $\bar{c}(x) = Ae^{\lambda_1 x} + Be^{\lambda_2 x}$, dove λ deve soddisfare la relazione $\lambda^2 - \frac{\delta\alpha}{D} = 0$, da cui segue che $\lambda_1 = \sqrt{\frac{\delta\alpha}{D}}$ e $\lambda_2 = -\sqrt{\frac{\delta\alpha}{D}}$. Le condizioni al bordo per ricavare le costanti A e B sono quelle del sistema di partenza (1.5), espresse in termini di concentrazione media, quindi

$$\begin{cases} \bar{c}(x=0) = C_0 \\ \frac{d\bar{c}}{dx}(x=L) = 0 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \bar{c}(x) = A + B = C_0 \\ \bar{c}(x) = \lambda_1 A e^{\lambda_1 L} + B \lambda_2 e^{\lambda_2 L} = 0 \end{cases}$$

Infine, la soluzione stazionaria mediata sulla verticale in coordinate cartesiane è data da

$$\bar{c}(x) = C_0 \frac{e^{-\sqrt{\frac{\delta\alpha}{D}}L}}{e^{\sqrt{\frac{\delta\alpha}{D}}L} + e^{-\sqrt{\frac{\delta\alpha}{D}}L}} (e^{\sqrt{\frac{\delta\alpha}{D}}x} - e^{-\sqrt{\frac{\delta\alpha}{D}}x}) + C_0 e^{-\sqrt{\frac{\delta\alpha}{D}}x} \quad (1.44)$$

Caso stazionario assialsimmetrico

In coordinate cilindriche (r, θ, z) , dal sistema (1.6), si ricava che allo stato stazionario deve valere la relazione

$$D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] - \delta H_{\Omega_c}(r, z) c(r, z) = 0 \quad (1.45)$$

In virtù della disuguaglianza $h \ll L$, con la stessa approssimazione del caso precedente, si possono trascurare le variazioni di concentrazione lungo la verticale e studiare la concentrazione media verticale data dalla (1.42). In questa maniera si ottiene la seguente equazione

$$\begin{aligned} \frac{D}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{d\bar{c}}{dr} \right) - \delta\alpha \bar{c}(r) &= 0 \\ \frac{D}{r} \left(\frac{d\bar{c}}{dr} \right) + r \frac{d^2\bar{c}}{dr^2} - \delta\alpha \bar{c}(r) &= 0 \end{aligned} \quad (1.46)$$

Dividendo per la costante diffusiva D e moltiplicando per la coordinata radiale r , si ricava la seguente equazione di Bessel modificata

$$r^2 \bar{c}'' + r \bar{c}' - \frac{\delta\alpha}{D} r^2 \bar{c} = 0 \quad (1.47)$$

Se si adimensionalizza la coordinata radiale rispetto alla lunghezza caratteristica $\eta = \sqrt{\frac{D}{\delta\alpha}}$, cioè si utilizza la coordinata adimensionale $\tilde{r} = \frac{r}{\eta}$, allora l'equazione di Bessel si trasforma in quella canonica

$$\tilde{r}^2 \frac{d^2\bar{c}}{d\tilde{r}^2} + \tilde{r} \frac{d\bar{c}}{d\tilde{r}} - \tilde{r}^2 \bar{c} = 0 \quad (1.48)$$

la quale ha soluzione analitica data da

$$\bar{c}(\tilde{r}) = AI_0(\tilde{r}) + BK_0(\tilde{r}) \quad (1.49)$$

A partire dalle condizioni al bordo del sistema (1.6), si possono ricavare le costanti A e B come segue

$$\left\{ \begin{array}{l} \bar{c}(r = r_0) = C_0 \\ \frac{d\bar{c}}{dr}(r = L) = 0 \end{array} \right. \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \bar{c}(\tilde{r} = \frac{r_0}{\eta}) = C_0 \\ \frac{d\bar{c}}{d\tilde{r}}(\tilde{r} = \frac{L}{\eta}) = 0 \end{array} \right. \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} A = \frac{C_0}{I_0(\frac{r_0}{\eta}) + \frac{I_1(\frac{L}{\eta})}{K_1(\frac{L}{\eta})} K_0(\frac{r_0}{\eta})} \\ B = A \frac{I_1(\frac{L}{\eta})}{K_1(\frac{L}{\eta})} \end{array} \right. \quad (1.50)$$

Dunque, la soluzione stazionaria mediata sulla verticale in coordinate cilindriche è la seguente

$$\bar{c}(r) = AI_0\left(\frac{r}{\eta}\right) + A \frac{I_1(\frac{L}{\eta})}{K_1(\frac{L}{\eta})} K_0\left(\frac{r}{\eta}\right) \quad (1.51)$$

Espansioni asintotiche in coordinate cilindriche

Si può ottenere una soluzione approssimata che sia funzione sia della coordinata radiale r che di quella verticale z , sfruttando le espansioni asintotiche rispetto al parametro $\epsilon = \frac{h}{L}$, che per definizione ha un valore molto basso. Si definiscono le variabili

$$\left\{ \begin{array}{l} \rho = r \\ \zeta = \frac{z}{\epsilon} \end{array} \right.$$

rispetto alle quali l'equazione stazionaria in coordinate cilindriche (1.45) diventa

$$\frac{1}{\rho} \frac{\partial}{\partial \rho} \left(\rho \frac{\partial c}{\partial \rho}(\rho, \zeta) \right) + \frac{1}{\epsilon^2} \frac{\partial^2 c}{\partial \zeta^2}(\rho, \zeta) - \frac{\delta}{D} H_{\Omega_c}(\rho, \zeta) c(\rho, \zeta) = 0 \quad (1.52)$$

$$H_{\Omega_c}(\rho, \zeta) = \begin{cases} 1 & \text{se } \zeta \leq \frac{\alpha h}{\epsilon} \\ 0 & \text{altrimenti} \end{cases}$$

Le condizioni al bordo e la condizione iniziale nel nuovo sistema di coordinate si trasformano in

$$\left\{ \begin{array}{l} c(\rho = r_0, \zeta) = C_0 \\ \frac{\partial c}{\partial \rho}(\rho = L, \zeta) = 0 \\ \frac{\partial c}{\partial \zeta}(\rho, \zeta = 0) = 0 \\ \frac{\partial c}{\partial \zeta}(\rho, \zeta = \frac{h}{\epsilon}) = 0 \end{array} \right. \quad (1.53)$$

Una maniera per ottenere una soluzione approssimata del problema, che dipenda anche dalla coordinata verticale, è considerare una soluzione in termini di espansioni asintotiche, cioè della forma

$$c(\rho, \zeta) = \bar{c}(\rho) + \epsilon c_1(\rho, \zeta) + \epsilon^2 c_2(\rho, \zeta) + .. \quad (1.54)$$

dove $\bar{c}(\rho)$ è la soluzione mediata sulla verticale ottenuta nella sezione precedente e riportata per esteso nella (1.51). Sostituendo la concentrazione con l'espansione asintotica (1.54) e trascurando gli ordini superiori al secondo, l'equazione (1.52) diventa

$$\begin{aligned} & \frac{1}{\rho} \frac{\partial}{\partial \rho} \left(\rho \frac{\partial \bar{c}}{\partial \rho}(\rho) \right) + \frac{1}{\epsilon^2} \frac{\partial^2 \bar{c}}{\partial \zeta^2}(\rho) - \frac{\delta}{D} H_{\Omega_c} \bar{c}(\rho) + \\ & \epsilon \frac{1}{\rho} \frac{\partial}{\partial \rho} \left(\rho \frac{\partial c_1}{\partial \rho}(\rho, \zeta) \right) + \frac{1}{\epsilon} \frac{\partial^2 c_1}{\partial \zeta^2}(\rho, \zeta) - \epsilon \frac{\delta}{D} H_{\Omega_c} c_1(\rho, \zeta) + \frac{\partial^2 c_2}{\partial \zeta^2}(\rho, \zeta) = 0 \end{aligned} \quad (1.55)$$

dove il secondo termine si annulla, perché $\bar{c}(\rho)$ non dipende da ζ . Moltiplicando l'espressione per ϵ e trascurando i termini di ordine superiore al primo, si ricava

$$\epsilon \frac{1}{\rho} \frac{\partial}{\partial \rho} \left(\rho \frac{\partial \bar{c}}{\partial \rho}(\rho) \right) - \epsilon \frac{\delta}{D} H_{\Omega_c} \bar{c}(\rho) + \frac{\partial^2 c_1}{\partial \zeta^2}(\rho, \zeta) + \epsilon \frac{\partial^2 c_2}{\partial \zeta^2}(\rho, \zeta) = 0 \quad (1.56)$$

da cui si ottiene un sistema per ogni ordine di ϵ , quindi

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial^2 c_1}{\partial \zeta^2}(\rho, \zeta) = 0 \quad (\text{ordine } 0) \\ c_1(\rho = r_0, \zeta) = 0 \\ c_1(\rho = L, \zeta) = 0 \\ \frac{\partial c_1}{\partial \zeta}(\rho, \zeta = 0) = 0 \\ \frac{\partial c_1}{\partial \zeta}(\rho, \zeta = \frac{h}{\epsilon}) = 0 \end{array} \right. \quad (1.57)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{\rho} \frac{\partial}{\partial \rho} \left(\rho \frac{\partial \bar{c}}{\partial \rho}(\rho) \right) - \frac{\delta}{D} H_{\Omega_c} \bar{c}(\rho) + \frac{\partial^2 c_2}{\partial \zeta^2}(\rho, \zeta) = 0 \quad (\text{ordine } 1) \\ c_2(\rho = r_0, \zeta) = 0 \\ c_2(\rho = L, \zeta) = 0 \\ \frac{\partial c_2}{\partial \zeta}(\rho, \zeta = 0) = 0 \\ \frac{\partial c_2}{\partial \zeta}(\rho, \zeta = \frac{h}{\epsilon}) = 0 \end{array} \right. \quad (1.58)$$

Dal sistema (1.57) segue che la funzione $c_1(\rho, \zeta)$ è identicamente nulla in tutto il dominio.

Inoltre, la concentrazione media \bar{c} soddisfa l'equazione $\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial \bar{c}}{\partial r} \right) - \frac{\delta}{D} \alpha \bar{c} = 0$, quindi

$$\frac{\partial^2 c_2}{\partial \zeta^2}(\rho, \zeta) = \frac{\delta}{D} H_{\Omega_c} \bar{c}(\rho) - \frac{\delta}{D} \alpha \bar{c}(\rho) \quad \Rightarrow \quad \left\{ \begin{array}{ll} \frac{\partial^2 u_1}{\partial \zeta^2}(\rho, \zeta) = \frac{\delta}{D} (1 - \alpha) \bar{c}(\rho) & \text{se } \zeta \leq \frac{\alpha h}{\epsilon} \\ \frac{\partial^2 u_2}{\partial \zeta^2}(\rho, \zeta) = -\frac{\delta}{D} \alpha \bar{c}(\rho) & \text{se } \zeta > \frac{\alpha h}{\epsilon} \end{array} \right. \quad (1.59)$$

dove per u_1 si intende la concentrazione di ossigeno nello strato inferiore, che coincide con $\zeta \leq \frac{\alpha h}{\epsilon} = \alpha L$, e per u_2 quella nello strato superiore, che si identifica con $\zeta > \frac{\alpha h}{\epsilon} = \alpha L$. Le condizioni da imporre consistono in due condizioni di flusso nullo al bordo, una condizione di continuità della concentrazione in corrispondenza dell'interfaccia e una di continuità del flusso in corrispondenza dell'interfaccia.

$$\begin{cases} \frac{\partial u_1}{\partial \zeta}(\rho, \zeta = 0) = 0 & \text{(bordo inferiore)} \\ \frac{\partial u_2}{\partial \zeta}(\rho, \zeta = \frac{h}{\epsilon} = L) = 0 & \text{(bordo superiore)} \\ u_1(\rho, \zeta = \alpha L) = u_2(\rho, \zeta = \alpha L) & \text{(continuità concentrazione)} \\ D \frac{\partial u_1}{\partial \zeta}(\rho, \zeta = \alpha L) = D \frac{\partial u_2}{\partial \zeta}(\rho, \zeta = \alpha L) & \text{(continuità flusso)} \end{cases} \quad (1.60)$$

Dal momento che la funzione media \bar{c} non dipende da ζ , le equazioni del sistema (1.59) si possono integrare due volte rispetto a ζ , per cui si ottiene

$$\begin{cases} u_1(\rho, \zeta) = \frac{\delta}{D}(1 - \alpha)\bar{c}(\rho)\frac{\zeta^2}{2} + A_1\zeta + B_1 & \zeta \leq \alpha L \\ u_2(\rho, \zeta) = -\frac{\delta}{D}\alpha\bar{c}(\rho)\frac{\zeta^2}{2} + A_2\zeta + B_2 & \zeta > \alpha L \end{cases} \quad (1.61)$$

e dalle condizioni (1.60) si possono calcolare le seguenti costanti

$$\begin{cases} \frac{\partial u_1}{\partial \zeta}(\rho, 0) = A_1 = 0 \\ \frac{\partial u_2}{\partial \zeta}(\rho, 0) = -\frac{\delta}{D}\alpha\bar{c}(\rho)L + A_2 = 0 \\ u_1(\rho, \alpha L) = u_2(\rho, \alpha L) \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} A_1 = 0 \\ A_2 = \frac{\delta}{D}\alpha\bar{c}(\rho)L \\ B_1 = \frac{\delta}{D}\alpha^2\bar{c}(\rho)\frac{L^2}{2} + B_2 \end{cases} \quad (1.62)$$

Si ricavano così due soluzioni che dipendono solo dalla costante B_2

$$\begin{cases} u_1(\rho, \zeta) = \frac{\delta}{D}(1 - \alpha)\bar{c}(\rho)\frac{\zeta^2}{2} + \frac{\delta}{D}\alpha^2\bar{c}(\rho)\frac{L^2}{2} + B_2 & \zeta \leq \alpha L \\ u_2(\rho, \zeta) = -\frac{\delta}{D}\alpha\bar{c}(\rho)\frac{\zeta^2}{2} + \frac{\delta}{D}\alpha L\bar{c}(\rho)\zeta + B_2 & \zeta > \alpha L \end{cases} \quad (1.63)$$

A questo punto si può osservare che $\bar{c}(\rho)$ è la media della concentrazione $c(\rho, \zeta)$ lungo la verticale e, visto che deve valere l'espressione (1.54), allora la componente $c_2(\rho, \zeta)$ deve essere a media nulla, cioè

$$\frac{1}{h} \int_0^h c_2(\rho, \zeta) d\zeta = \frac{1}{h} \int_0^{\alpha L} u_1(\rho, \zeta) d\zeta + \frac{1}{h} \int_{\alpha L}^L u_2(\rho, \zeta) d\zeta \quad (1.64)$$

Da questa ulteriore condizione segue che $B_2 = -\frac{\delta}{D}\frac{\alpha L^2}{6}\bar{c}(\rho)(\alpha^2 + 2)$, che sostituito nell'espressione delle concentrazioni u_1 e u_2 restituisce

$$\begin{cases} u_1(\rho, \zeta) = \frac{\delta}{D}(1 - \alpha)\bar{c}(\rho)\frac{\zeta^2}{2} + \frac{\delta}{D}\alpha^2\bar{c}(\rho)\frac{L^2}{2} - \frac{\delta}{D}\frac{\alpha L^2}{6}\bar{c}(\rho)(\alpha^2 + 2) & \zeta \in [0, \alpha L] \\ u_2(\rho, \zeta) = -\frac{\delta}{D}\alpha\bar{c}(\rho)\frac{\zeta^2}{2} + \frac{\delta}{D}\alpha\bar{c}(\rho)L\zeta - \frac{\delta}{D}\frac{\alpha L^2}{6}\bar{c}(\rho)(\alpha^2 + 2) & \zeta \in [\alpha L, L] \end{cases} \quad (1.65)$$

Per esprimere la soluzione in funzione della coordinata verticale di partenza, $z = \epsilon\zeta$, si può osservare che se $\zeta \in [0, \alpha L]$, allora $z \in [0, \alpha h]$, invece $\zeta \in [\alpha L, L]$ equivale a $z \in [\alpha h, h]$, mentre $r = \rho$. Quindi la concentrazione di ossigeno in funzione delle coordinate di partenza, r e z è data da

$$c(r, z) = \bar{c}(r) + \epsilon^2 c_2(r, z) = \begin{cases} \bar{c}(r) + \epsilon^2 u_1(r, \frac{z}{\epsilon}) & z \in [0, \alpha h] \\ \bar{c}(r) + \epsilon^2 u_2(r, \frac{z}{\epsilon}) & z \in [\alpha h, h] \end{cases}$$

ossia

$$\begin{cases} c(r, z) = \bar{c}(r) + \frac{\delta}{D} \bar{c}(r) \left[(1 - \alpha) \frac{z^2}{2} + \frac{\alpha h^2}{6} (3\alpha - \alpha^2 - 2) \right] & z \in [0, \alpha h] \\ c(r, z) = \bar{c}(r) + \frac{\delta}{D} \bar{c}(r) \left[-\alpha \frac{z^2}{2} + \alpha h z - \frac{\alpha h^2}{6} (\alpha^2 + 2) \right] & z \in [\alpha h, h] \end{cases} \quad (1.66)$$

Condizione di assorbimento nel limite di spessore dello strato cellulare nullo

Poiché lo strato di cellule che assorbono ossigeno è molto sottile, si può sostituire il termine di assorbimento con una condizione di Neumann sul bordo inferiore, nel limite per α che tende a 0. A partire dall'espressione (1.66), visto che la concentrazione media non dipende dalla coordinata verticale, si ricava

$$D \frac{\partial c}{\partial z}(z = \alpha h) = D \frac{\partial \bar{c}(r)}{\partial z} + D \frac{\delta}{D} \bar{c}(r) [(1 - \alpha) z] \Big|_{z=\alpha h} = \delta \bar{c}(r) (1 - \alpha) \alpha h \quad (1.67)$$

Quindi, trascurando i termini del secondo ordine in α , si può dedurre la condizione

$$D \frac{\partial c}{\partial z}(z = \alpha h) = \delta c(r) \alpha h \quad (1.68)$$

La precedente relazione può essere sfruttata per ricavare la soluzione analitica del problema stazionario bidimensionale, che può essere scritto nella seguente maniera

$$\begin{cases} D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}(x, y) + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2}(x, y) \right) = 0 & (x, y) \in (0, L) \times (0, h) \\ c(r_0, y) = C_0, \quad \frac{\partial c}{\partial x}(L, y) = 0 & y \in [0, h] \\ \frac{\partial c}{\partial y}(x, h) = 0, \quad \frac{\partial c}{\partial y}(x, 0) = \frac{\delta}{D} c(x) \alpha h = f(c, x) & x \in [0, L] \end{cases} \quad (1.69)$$

Per risolvere il sistema, si può cercare una soluzione del tipo $c(x, y) = q(x, y) + w(x, y)$ dove le funzioni q e w soddisfano il sistema (1.69) e quindi le condizioni al bordo

$$\begin{cases} q(r_0, y) = 0 \\ \frac{\partial q}{\partial x}(L, y) = 0 \\ \frac{\partial q}{\partial y}(x, h) = 0 \\ \frac{\partial q}{\partial y}(x, 0) = f(c, x) \end{cases} \quad \begin{cases} w(r_0, y) = C_0 \\ \frac{\partial w}{\partial x}(L, y) = 0 \\ \frac{\partial w}{\partial y}(x, h) = 0 \\ \frac{\partial w}{\partial y}(x, 0) = 0 \end{cases} \quad (1.70)$$

In primo luogo si risolve il problema relativo alla funzione w , che, per il metodo della separazione delle variabili, si ipotizza sia del tipo $w(x, y) = M(x)N(y)$. Dunque, deve valere l'equazione

$$\frac{M''(x)}{M(x)} + \frac{N''(y)}{N(y)} = 0 \iff \frac{N''(y)}{N(y)} = -\frac{M''(x)}{M(x)} = -k \quad (1.71)$$

Se $k = p^2$, allora la funzione della variabile y sarà della forma $N(y) = A \cos(py) + B \sin(py)$. Dalle condizioni al contorno si ottengono le seguenti relazioni

$$\begin{aligned} N'(h) &= -Ap \sin(ph) + Bp \cos(ph) = 0 \Rightarrow B = A \tan(ph) \\ N'(0) &= Bp \cos(0) = Aptan(ph) = 0 \Rightarrow ph = n\pi \Rightarrow p_n = \frac{n\pi}{h} \quad n \geq 0 \end{aligned} \quad (1.72)$$

dalle quali si deduce che la funzione è data da $N_n(y) = A_n \cos(\frac{n\pi}{h}y)$. Procedendo alla stessa maniera per la funzione della variabile x , si risolve l'equazione

$$M''(x) = kM(x) \quad \text{con} \quad k_n = p_n^2 = \left(\frac{n\pi}{h}\right)^2 \quad (1.73)$$

che ha soluzione del tipo

$$M_n(x) = C_n e^{\sqrt{k_n}x} + D_n e^{-\sqrt{k_n}x} \quad (1.74)$$

Dalla condizione lungo il bordo esterno si ricava la costante D_n , per cui

$$M'(L) = C_n \sqrt{k_n} e^{\sqrt{k_n}L} + D_n \sqrt{k_n} e^{-\sqrt{k_n}L} = 0 \Rightarrow D_n = C_n e^{2\sqrt{k_n}L} \quad (1.75)$$

$$M_n(x) = C_n (e^{\sqrt{k_n}x} + e^{\sqrt{k_n}(2L-x)}) \quad (1.76)$$

Si può, quindi, scrivere il secondo addendo della soluzione $c(x, y) = h(x, y) + w(x, y)$ a partire dalla funzione $w_n(x, y)$ e ricavare poi la costante attraverso la condizione al bordo interno come segue

$$\begin{aligned} w_n(x, y) &= M_n(x)N_n(y) = C_n (e^{\sqrt{k_n}x} + e^{\sqrt{k_n}(2L-x)}) A_n \cos\left(\frac{n\pi}{h}y\right) \\ w(x, y) &= \sum_{n=0}^{+\infty} E_n (e^{\sqrt{k_n}x} + e^{\sqrt{k_n}(2L-x)}) \cos\left(\frac{n\pi}{h}y\right) \end{aligned} \quad (1.77)$$

$$\begin{aligned} w(r_0, y) &= C_0 = 2E_0 + \sum_{n=1}^{+\infty} E_n (e^{\sqrt{k_n}r_0} + e^{\sqrt{k_n}(2L-r_0)}) \cos\left(\frac{n\pi}{h}y\right) \\ E_0 &= \frac{1}{2h} \int_0^h C_0 dy = \frac{C_0}{2} \\ E_n (e^{\sqrt{k_n}x} + e^{\sqrt{k_n}(2L-x)}) &= \frac{1}{h} \int_0^h C_0 \cos\left(\frac{n\pi}{h}y\right) dy = 0 \end{aligned} \quad (1.78)$$

In definitiva, si ha che $w(x, y) = C_0$, quindi la funzione è costante.

Per ricavare, invece, il primo addendo $q(x, y)$, come nel caso precedente, si ipotizza che $q(x, y) = X(x)Y(y)$ e $\lambda = p^2$, quindi l'equazione

$$\frac{X''(x)}{X(x)} + \frac{Y''(y)}{Y(y)} = 0 \iff -\frac{Y''(y)}{Y(y)} = \frac{X''(x)}{X(x)} = -\lambda \quad (1.79)$$

ha soluzione nella variabile x del tipo $X(x) = A \cos(px) + B \sin(px)$. Dalle condizioni al bordo segue che

$$\begin{aligned} X(r_0) &= A \cos(pr_0) + B \sin(pr_0) = 0 \Rightarrow A = -B \tan(pr_0) \\ X'(L) &= Ap \sin(pL) + Bp \cos(pL) = 0 \iff \cos(p(r_0 - L)) = 0 \iff p_n = \frac{\pi(2n+1)}{2(r_0 - L)} \end{aligned} \quad (1.80)$$

$$X_n(x) = B_n(-\tan(p_n r_0) \cos(p_n x) + \sin(p_n x)) \quad (1.81)$$

Nella variabile y , invece, si ha $Y''(y) = \lambda Y(y)$, con soluzione $Y_n(y) = C_n e^{p_n y} + D_n e^{-p_n y}$, dove la costante D_n si può ricavare dalla condizione al bordo come segue

$$Y'_n(h) = C_n p_n e^{p_n h} + D_n p_n e^{-p_n h} = 0 \Rightarrow D_n = C_n e^{2p_n h} \quad (1.82)$$

Si ottiene così la funzione $Y_n(y) = C_n(e^{p_n y} + e^{p_n(2h-y)})$, che combinata con $X(x)$ restituisce il primo addendo della soluzione complessiva

$$\begin{aligned} q_n(x, y) &= B_n(-\tan(p_n r_0) \cos(p_n x) + \sin(p_n x)) C_n (e^{p_n y} + e^{p_n(2h-y)}) \\ q(x, y) &= \sum_{n=0}^{+\infty} F_n(-\tan(p_n r_0) \cos(p_n x) + \sin(p_n x))(e^{p_n y} + e^{p_n(2h-y)}) \end{aligned} \quad (1.83)$$

dove il coefficiente F_n si può ricavare dall'ultima condizione al bordo, che è data da

$$\frac{\partial q}{\partial y}(x, 0) = f(c, x) = \frac{\delta}{D} c(x) \alpha h \quad (1.84)$$

da cui, sfruttando la relazione (1.83), segue che

$$\begin{aligned} \sum_{n=0}^{+\infty} F_n(-\tan(p_n r_0) \cos(p_n x) + \sin(p_n x)) p_n (1 - e^{2p_n h}) &= \frac{\delta}{D} (C_0 + q(x, 0)) \alpha h \\ &= \frac{\delta}{D} \alpha h \left(C_0 + \sum_{n=0}^{+\infty} F_n(-\tan(p_n r_0) \cos(p_n x) + \sin(p_n x)) (1 + e^{2hp_n}) \right) \end{aligned} \quad (1.85)$$

Infine, la concentrazione nel dominio bidimensionale con la condizione di flusso al bordo inferiore è data da

$$\begin{aligned} c(x, y) &= \sum_{n=0}^{+\infty} E_n (e^{\sqrt{k_n} x} + e^{\sqrt{k_n} (2L-x)}) \cos\left(\frac{n\pi}{h} y\right) \\ &\quad + \sum_{n=0}^{+\infty} F_n(-\tan(p_n r_0) \cos(p_n x) + \sin(p_n x))(e^{p_n y} + e^{p_n(2h-y)}) \end{aligned} \quad (1.86)$$

1.4 Simulazioni e validazione numerica di alcune soluzioni analitiche

Sono state effettuate simulazioni numeriche nei due domini tridimensionali precedentemente descritti e rappresentati nelle Figure 1.3 e 1.5 con il software Comsol Multiphysics, per verificare la correttezza delle soluzioni analitiche ricavate e valutare l'impatto delle ipotesi semplificative effettuate per ottenerle. I parametri relativi alla diffusione e all'assorbimento dell'ossigeno sono stati scelti a partire da un range riportato in letteratura. In [11], si fa riferimento a un rate di assorbimento dell'ossigeno δ compreso tra i valori $1.66 \cdot 10^{-5}$ e $5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, mentre sia nell'articolo appena citato sia in [12] si impone un coefficiente di diffusione dell'ossigeno D compreso tra $2.1 \cdot 10^{-5}$ e $1.75 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. In questo caso, a partire dai risultati di Honda [5], si è individuata una lunghezza diffusiva caratteristica λ circa pari a 0.55 mm, quindi i parametri δ e D sono stati scelti in modo tale che la lunghezza $\lambda = \sqrt{\frac{D}{\delta}}$ si avvicinasse il più possibile a quella in vitro e si è posto $\delta = 5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $D = 1.75 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, da cui $\lambda = 0.58 \text{ mm}$. Per riprodurre l'esperimento di Honda [5], non sono state fatte assunzioni semplificative per ricavare la soluzione numerica e nella Figura 1.6 si può osservare che la soluzione raggiunge lo stato stazionario dopo circa 20 minuti e l'andamento che si ricava è coerente sia con la soluzione (1.10) in coordinate cartesiane sia con la soluzione (1.16) del problema assialsimmetrico. Anche per l'esperimento di Arocena [10] sono stati adottati gli stessi parametri diffusivi, ma, a differenza del precedente caso, si osserva che la concentrazione di equilibrio è raggiunta dopo circa un'ora. Essa è riportata in Figura 1.7 e coincide con la soluzione analitica (1.51) del problema assialsimmetrico. Infine, è necessario sottolineare la differenza sostanziale in termini di concentrazione di ossigeno tra l'effettiva dinamica dell'esperimento di Arocena, descritto in [10], e quella ottenuta analiticamente semplificando la condizione al bordo. Infatti, la soluzione $\bar{c}(x)$ riportata nella (1.51) si ottiene assumendo che il bordo a contatto con l'ambiente esterno sia quello verticale in corrispondenza dell'ascissa r_0 , mentre in realtà il bordo a contatto con l'ossigeno esterno è sulla parte superiore del vetrino tra l'ascissa 0 e r_0 . Con la condizione al bordo effettiva si ottiene un profilo di concentrazione molto più basso rispetto al caso semplificato, come si evidenzia nella Figura 1.8, quindi la condizione di ipossia nel vetrino è ancora più severa di quella stimata analiticamente.

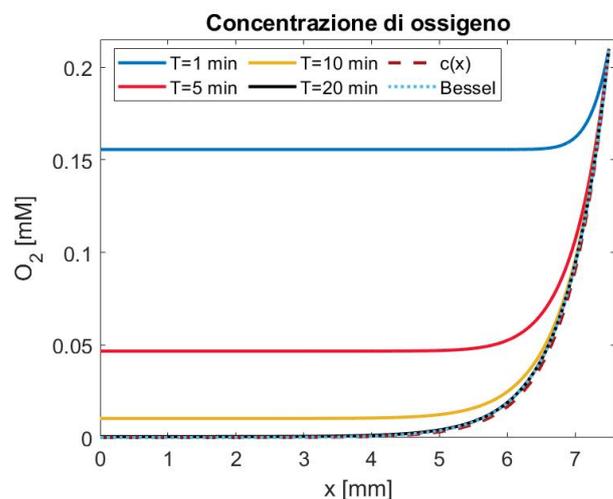


Figura 1.6: Confronto tra le soluzioni numeriche e analitiche per la concentrazione di ossigeno nell'esperimento di Honda, dove T è il tempo a cui corrisponde la curva risultato della simulazione numerica, $c(x)$ è la concentrazione stazionaria della (1.10) e Bessel si riferisce alla soluzione (1.16) del problema tridimensionale stazionario.

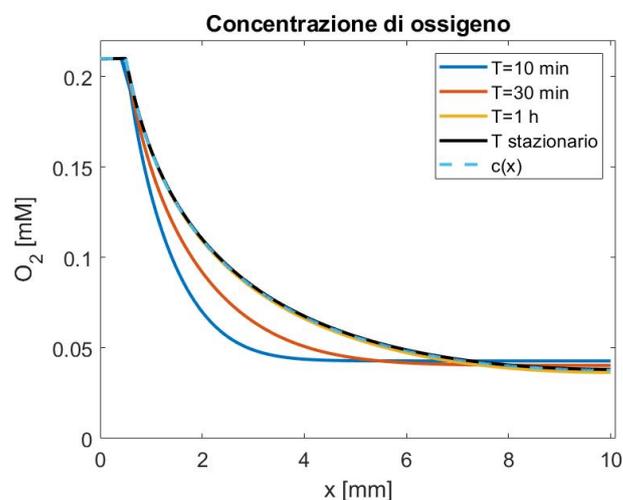


Figura 1.7: Confronto tra le soluzioni numeriche e analitiche per la concentrazione di ossigeno nell'esperimento di Arocena, dove T è il tempo a cui corrisponde la curva risultato della simulazione numerica, T stazionario indica la curva ottenuta allo stazionario dalla simulazione numerica e $c(x)$ è la concentrazione della (1.51) ottenuta analiticamente, che è soluzione del problema (1.6) tridimensionale mediato sulla verticale.

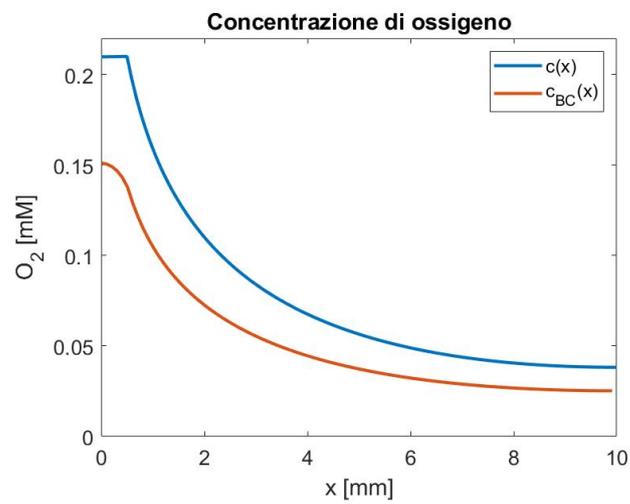


Figura 1.8: Confronto tra la curva $c(x)$, che rappresenta la concentrazione di ossigeno per l'esperimento di Arocena allo stato stazionario, cioè la soluzione (1.51) ottenuta mediando sulla verticale, e la curva $c_{BC}(x)$, ossia la concentrazione di ossigeno allo stato stazionario mediata sulla verticale, ottenuta imponendo la reale condizione al bordo dell'esperimento.

Capitolo 2

Risposta cellulare all'ipossia e all'acidosi

L'espressione dei fattori inducibili dell'ipossia, denominati HIF, costituisce uno degli effetti più indagati e rilevanti della carenza di ossigeno in tessuti cellulari. La dinamica che provoca l'aumento di concentrazione di HIF è molto complessa e coinvolge diversi componenti biologici, quindi si è cercato di capire quali siano i fattori più influenti biologicamente e di cogliere le caratteristiche principali del processo, al fine di rappresentarlo attraverso un modello matematico.

2.1 Il processo biologico

La risposta adattativa dell'organismo all'ipossia coinvolge maggiormente i fattori di trascrizione HIF1 e HIF2. Questi sono eterodimeri costituiti da due subunità proteiche, quella HIF- α , che è disponibile solo durante l'ipossia, e quella HIF- β che invece è sempre costitutivamente espressa. In normossia, gli enzimi prolin idrossilasi PHD, catalizzano una reazione di idrossilazione di HIF con l'aggiunta del gruppo -OH, che quindi necessita di ossigeno. Soltanto il fattore HIF idrossilato può essere riconosciuto dal complesso VHL e degradato nel proteasoma, mentre in mancanza di ossigeno il processo di degradazione non ha luogo. Così la subunità HIF- α può traslocare indisturbata nel nucleo, unirsi a quella β e il dimero costituito da entrambe le subunità agisce come fattore di trascrizione nel nucleo. L'accumulo di HIF in ipossia avviene in maniera abbastanza rapida, ma, se il tessuto viene riossigenato, le subunità α vengono di nuovo degradate altrettanto velocemente [13]. In realtà, i fattori inducibili dall'ipossia sono presenti in tre isoforme, HIF1, HIF2 e HIF3, ma quest'ultimo risulta ancora difficile da caratterizzare, soprattutto dal punto di vista quantitativo [13]. Nonostante le similitudini nella struttura e nel ruolo che ricoprono, le isoforme HIF1- α e HIF2- α si differenziano per espressione tissutale, regolazione temporale e specificità genica [14]. Entrambe subiscono la reazione di idrossilazione da parte degli enzimi PHD2 e PHD3, attraverso un meccanismo di feedback negativo in caso di normossia, ma al tempo stesso ne stimolano la produzione. Questi enzimi non costituiscono gli unici componenti che influiscono sulla diminuzione della concentrazione di HIF, ma, come

sottolineato da Filatova et al. in [4], anche il pH può essere responsabile della regolazione di HIF, in maniera del tutto indipendente dall'attività degli PHD. Il processo di regolazione di HIF da parte del pH avviene attraverso la proteina da shock termico HSP90, che protegge le molecole dalla degradazione. Essa, inoltre, compete con un'altra proteina, chiamata RACK1 [15], che inibisce HSP90 favorendo così una degradazione di HIF simile a quella del complesso VHL, ma indipendente dai livelli di ossigeno [16]. La relazione tra acidosi e HIF è stata evidenziata da Filatova et al. attraverso esperimenti in vitro su cellule di glioblastoma a pH fissato, il cui risultato è descritto più nel dettaglio in [4]. Negli studi, sono state rilevate le variazioni di HIF in funzione di diversi valori del pH sia a concentrazione di ossigeno fissata sia in normossia, dove la stimolazione O₂-dipendente viene meno. Per questo motivo si registra un'influenza del pH sull'espressione di fattore HIF nei tessuti cellulari, indipendente dall'azione degli PHD. La concentrazione di HIF rilevata per ogni valore di pH evidenzia che, in ambienti molto acidi, la concentrazione del fattore HIF si riduce, così come in quelli molto basici, invece, nel range di valori di pH tra 6.6 e 6.8, l'espressione di HIF è massima.

2.2 Alcuni modelli in letteratura

Negli ultimi venti anni sono stati elaborati e testati diversi modelli matematici che riproducono gli effetti dell'ipossia sull'espressione del fattore HIF per differenti livelli di dettaglio. Ad esempio, quello di Bagnall e Leedale [17], descrive l'interazione tra HIF1 e PHD1, PHD2 e PHD3 e, coerentemente con la dinamica biologica, riproduce un incremento della concentrazione di HIF dopo una certa esposizione all'ipossia. Successivamente, in [18], gli stessi autori propongono un modello matematico per la dinamica di feedback tra HIF1 e PHD, inserendo una soglia di saturazione per la degradazione di HIF1 da parte degli enzimi, in modo da riprodurre i dati sperimentali ottenuti. Anche lo studio di Bocharov [19] propone un sistema di equazioni differenziali per modellare matematicamente il comportamento di HIF1, non sono in relazione agli enzimi PHD, ma anche ai principali prodotti intermedi del metabolismo cellulare. Un altro modello matematico dell'influenza dell'ossigeno sul fattore HIF è quello sviluppato da Nguyen et al. in [20], dove il network di segnali mediati dall'ossigeno che influenzano HIF è riprodotto da un sistema di equazioni differenziali ordinarie, dove si include anche il fattore FIH, che inibisce HIF e ha un'azione simile a quella di PHD. Più recentemente, invece, Ferrante e Preziosi [21] hanno sviluppato un modello di risposta infiammatoria all'ipossia, in cui le equazioni riproducono nel dettaglio l'interazione tra HIF1, HIF2, PHD2 e PHD3, mediata dall'ossigeno, per studiare gli effetti dell'ipossia sull'infiammazione dei tessuti.

2.3 Il modello matematico

Dal modello sviluppato da Ferrante et al. [21] e da quello di Bagnall et al. [17], sulla base delle evidenze sperimentali, risulta che il picco del fattore HIF1 in condizioni di ipossia si verifica dopo circa un paio di ore e la sua concentrazione allo stato stazionario tende ad essere molto più elevata rispetto alla condizione normossica. Invece, la sovraespressione

del fattore HIF2 si osserva dopo circa 24 ore, quindi risulta rilevante solo se si analizza il sistema in ipossia su scale temporali molto lunghe, che spesso non sono contemplate opportunamente negli esperimenti. In questo contesto, si è scelto di semplificare il sistema e considerare solo la dinamica tra il fattore HIF1 e l'enzima PHD2, dal momento che si vuole cercare di riprodurre il comportamento di cellule in vitro su scale temporali dell'ordine di qualche ora, per il primo setting [5], e di 24 ore per il secondo [10].

Il modello matematico oggetto di studio è costituito da due equazioni differenziali ordinarie, una per la concentrazione di HIF1, rappresentata dalla variabile H_1 , e una per quella di PHD2, rappresentata dalla variabile P_2 . Queste coincidono con le prime due equazioni del modello di Ferrante e Preziosi [21], dove viene studiata una dinamica più complessa. In particolare, la concentrazione di HIF1 aumenta con un rate di produzione γ_1 e si riduce sia per decadimento naturale, con un tasso δ_1 , sia a seguito dell'azione dell'enzima PHD2. Esso, in particolare, inibisce HIF1 in presenza di ossigeno, la cui azione è regolata dalla funzione $g_{12}(O_2)$ crescente in O_2 . La concentrazione di PHD2, invece, si riduce naturalmente con un tasso δ_{P_2} e viene incrementata dall'attivazione da parte di HIF1, con un rate γ_{21} . Il sistema ha quindi la struttura di loop di inibizione e attivazione che è riportata in Figura 2.1, dove l'inibizione di HIF1 da parte di PHD2 è influenzata dalla concentrazione di ossigeno.

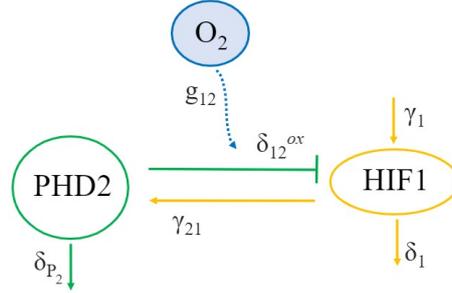


Figura 2.1: Schematizzazione delle reazioni di attivazione e inibizione che coinvolgono ossigeno, HIF e PHD nel modello matematico.

Le equazioni precedentemente descritte si traducono matematicamente nel seguente sistema

$$\begin{cases} \frac{dH_1}{dt} = \gamma_1 - \delta_1 H_1 - \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) F_{12}(H_1) P_2 \\ \frac{dP_2}{dt} = \gamma_{21} \Gamma_2(H_1) - \delta_{P_2} P_2 \end{cases} \quad (2.1)$$

dove O_2 è la concentrazione di ossigeno e i termini $g_{12}(O_2)$ e $F_{12}(H_1)$ rappresentano rispettivamente il ruolo dell'ossigeno e dell'HIF1 nell'eliminazione di HIF1 stesso. La prima funzione consente di inserire una degradazione di HIF1 proporzionale alla concentrazione di ossigeno, mentre la seconda introduce una dipendenza crescente della degradazione anche rispetto alla concentrazione di HIF1. Per i termini appena descritti sono state scelte

le seguenti funzioni crescenti di tipo Michaelis-Menten

$$g_{12}(O_2) = \frac{O_2}{K_{12}^{ox} + O_2} \quad F_{12}(H_1) = \frac{H_1}{K_{12} + H_1} \quad (2.2)$$

Nella seconda equazione del sistema (2.1), invece, la funzione $\Gamma_2(H_1)$ simula la produzione della molecola PHD2 a opera di HIF1, quindi è crescente nella concentrazione di HIF1, mentre si annulla quando HIF1 è assente, cioè

$$\frac{d\Gamma_2}{dH_1}(H_1) > 0 \quad \Gamma_2(0) = 0 \quad (2.3)$$

In questo caso, per non complicare troppo il modello e in mancanza di dati sperimentali opportuni, è stata scelta la funzione più semplice con le precedenti proprietà, cioè quella lineare

$$\Gamma_2(H_1) = H_1 \quad (2.4)$$

Seguendo lo studio effettuato in [21], è interessante analizzare il sistema (2.1) allo stato stazionario e ricavare gli equilibri, i quali si ottengono imponendo che la variazione temporale di entrambe le variabili H_1 e P_2 sia nulla

$$\begin{cases} \gamma_1 - \delta_1 H_1 - \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) F_{12}(H_1) P_2 = 0 \\ \gamma_{21} \Gamma_2(H_1) - \delta_{P_2} P_2 = 0 \end{cases} \quad (2.5)$$

Dalla seconda equazione si ricava un'espressione di PHD2 allo stato stazionario, in funzione dei parametri del problema e della concentrazione di HIF1 all'equilibrio

$$P_2^{eq} = \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}} \Gamma_2(H_1^{eq}) = \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}} H_1^{eq} \quad (2.6)$$

Dalla prima relazione, invece, sostituendo con l'espressione (2.6) appena ottenuta per P_2^{eq} , si ricava la seguente equazione di secondo grado nella concentrazione di HIF1 all'equilibrio e la relativa soluzione H_1^{eq}

$$(\delta_1 + \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}}) (H_1^{eq})^2 - (\gamma_1 - \delta_1 K_{12}) H_1^{eq} - \gamma_1 K_{12} = 0 \quad (2.7)$$

$$H_1^{eq} = \frac{\gamma_1 - \delta_1 K_{12} \pm \sqrt{(\gamma_1 - \delta_1 K_{12})^2 + 4\gamma_1 K_{12} (\delta_1 + \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}})}}{2(\delta_1 + \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}})} \quad (2.8)$$

L'unica soluzione accettabile, tra le due della (2.8), è quella con segno positivo, perché non sono ammissibili valori di concentrazione negativi, quindi le concentrazioni di HIF1 e PHD2 all'equilibrio sono date da

$$\begin{aligned} H_1^{eq} &= \frac{\gamma_1 - \delta_1 K_{12} + \sqrt{(\gamma_1 - \delta_1 K_{12})^2 + 4\gamma_1 K_{12} (\delta_1 + \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}})}}{2(\delta_1 + \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}})} \\ P_2^{eq} &= \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}} H_1^{eq} \end{aligned} \quad (2.9)$$

Per includere nel sistema il pH e i suoi effetti sulla concentrazione di HIF1 si è scelto di non coinvolgere direttamente la proteina HSP90, visto che il relativo network proteico risulta di recente investigazione biologica e non si hanno ancora evidenze biologiche quantitative. Si è optato, invece, per una modifica del precedente sistema di equazioni (2.1), dove si inserisce la dipendenza dal pH nel termine di degradazione, $\delta_1 H_1$, nella prima equazione in (2.1). Partendo quindi dal modello sopra illustrato, si procede all'aggiunta della dipendenza dal pH nel termine di degradazione O_2 -dipendente. Se prima questo termine si poteva valutare a pH fissato, cioè a tasso di degradazione costante, ora la dipendenza dal pH, che viene lasciato variare, comporterà un tasso di degradazione variabile. Per fare ciò, almeno in un primo momento, si è scelto di adottare un profilo di pH costante nel tempo. Visto che il valore del pH segue direttamente da quello della concentrazione di ioni idrogeno H^+ , si può imporre una distribuzione di ioni H^+ nel dominio, in modo tale che il pH interno ed esterno abbiano un certo valore fissato, e ricavare poi l'andamento del pH alla luce della relazione $pH = -\log_{10}[H^+]$. Diversi studi, tra i quali ad esempio [22] e [5], dimostrano che un ambiente ipossico favorisce la produzione di ioni H^+ e quindi incrementa l'acidità delle cellule. Nel setting dell'esperimento 1, già dopo pochi secondi, la concentrazione di ossigeno è molto bassa al centro del vetrino, allora si può ipotizzare che la concentrazione di ioni sia più alta all'interno e si riduca andando verso l'esterno del dominio. Pertanto, una possibile concentrazione degli ioni idrogeno nel setting di Honda è quella riportata nella Figura 2.2a ed è data dall'espressione

$$H^+(x) = \frac{(H_{int} - H_{ext})}{(1 - e^{-\sigma L})} (1 - e^{\sigma(x-L)}) + H_{ext} \quad (2.10)$$

dove H_{ext} è la concentrazione di ioni H^+ sul bordo esterno a contatto con l'ambiente circostante e H_{int} quella al centro del dominio. La precedente distribuzione è coerente con la fisica del fenomeno, perché è decrescente verso il bordo, e da una tale concentrazione si ricava un profilo crescente di pH, come quello riportato nella Figura 2.2b, quindi più acido al centro e basico ai bordi. I dati riportati in Honda [5] sono qualitativamente in accordo con il profilo di pH ottenuto, in quanto evidenziano la presenza di un forte gradiente di pH in corrispondenza del bordo esterno.

Noto il valore del pH nel dominio, si può modificare il modello considerando un coefficiente di degradazione di HIF1, δ_1 , non più costante, ma dipendente dal pH. Per ipotizzare una funzione di degradazione pH-dipendente a partire dal modello stesso, si può considerare il sistema allo stato stazionario e in condizioni di normossia. Sotto questa ipotesi, poiché l'ossigeno inibisce la produzione di HIF1, la concentrazione di quest'ultimo resta molto limitata e di conseguenza la funzione $F_{12}(H_1)$ assume valori molto bassi. Pertanto, l'ultimo termine della prima equazione di equilibrio in (2.5) può essere trascurato, cioè

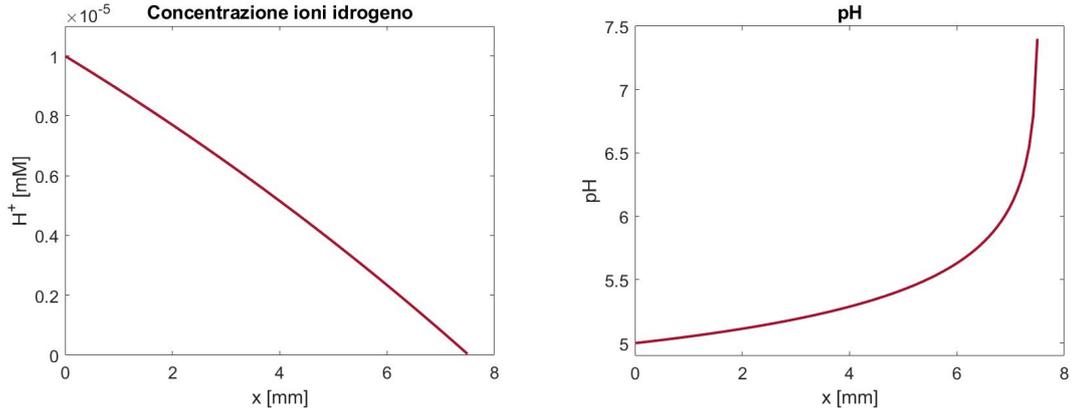
$$\gamma_1 - \delta_1 H_1 - \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) F_{12}(H_1) P_2 \approx \gamma_1 - \delta_1 H_1 = 0 \quad (2.11)$$

A questo punto, si può inserire la dipendenza dal pH sostituendo una funzione di degradazione δ_{pH} al parametro δ_1 come segue

$$\gamma_1 - \delta_{pH} H_1 = 0 \quad (2.12)$$

Dalla precedente equazione si può ricavare δ_{pH} come funzione della concentrazione di HIF1 all'equilibrio nella seguente maniera

$$\delta_{pH} = \frac{\gamma_1}{H_1^{eq}} = \phi(H_1^{eq}) \quad (2.13)$$



(a) Concentrazione di ioni idrogeno, lungo una sezione orizzontale che si estende dal centro, $x = 0$, al bordo, $x = L$, del vetrino con $\sigma = 50$.

(b) Andamento del pH lungo una sezione orizzontale che si estende dal centro al bordo del vetrino.

Figura 2.2: Grafici della concentrazione di ioni idrogeno e del pH nel setting dell'esperimento 1.

A valle delle considerazioni effettuate, il sistema che regola la dinamica HIF1-PHD2 si può riscrivere come

$$\begin{cases} \frac{dH_1}{dt} = \gamma_1 - \delta_{pH}H_1 - \delta_{12}^{ox}g_{12}(O_2)F_{12}(H_1)P_2 \\ \frac{dP_2}{dt} = \gamma_{21}\Gamma_2(H_1) - \delta_{P_2}P_2 \end{cases} \quad (2.14)$$

Alcune fonti in letteratura, come ad esempio [4], evidenziano che la concentrazione di HIF1 dipende dal valore del pH e, in particolare, la concentrazione di HIF1 è massima intorno ad un valore di pH di 6.7 e poi decresce sia per valori più acidi sia per valori più basici, come riportato in Figura 2.3.

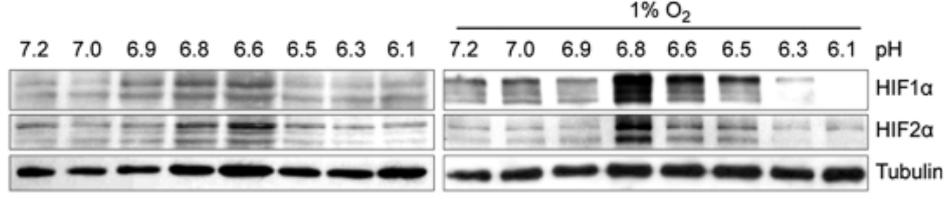


Figura 2.3: Concentrazione di HIF in funzione del pH in normossia e in ipossia ottenuta dagli esperimenti effettuati da Filatova et al. in [4].

Quindi, l'andamento di HIF1 al variare del pH può essere stimato con una curva $H_1^{eq}(pH)$ che presenta un massimo in corrispondenza del valore 6.7. Poiché si tratta di un'approssimazione, l'espressione della curva non è univoca, ma si possono considerare diverse funzioni, aventi lo stesso valore massimo di HIF1 in 6.7, da cui poi ricavare la funzione di degradazione come

$$\delta_{pH}(pH) = \phi(H_1^{eq}(pH)) \quad (2.15)$$

Una possibile curva che può riprodurre la concentrazione del fattore HIF1 in funzione del pH è data dalla somma tra una costante C e una funzione gaussiana, al variare di una costante moltiplicativa β all'esponente, che analiticamente è data da

$$H_{1,gauss}^{eq}(pH) = C + e^{-\beta(pH-6.7)^2} \quad (2.16)$$

In alternativa, si può considerare una concentrazione di tipo parabolico, quindi la seguente curva di secondo grado

$$H_{1,par}^{eq}(pH) = p_1 pH^2 + p_2 pH + p_3 \quad (2.17)$$

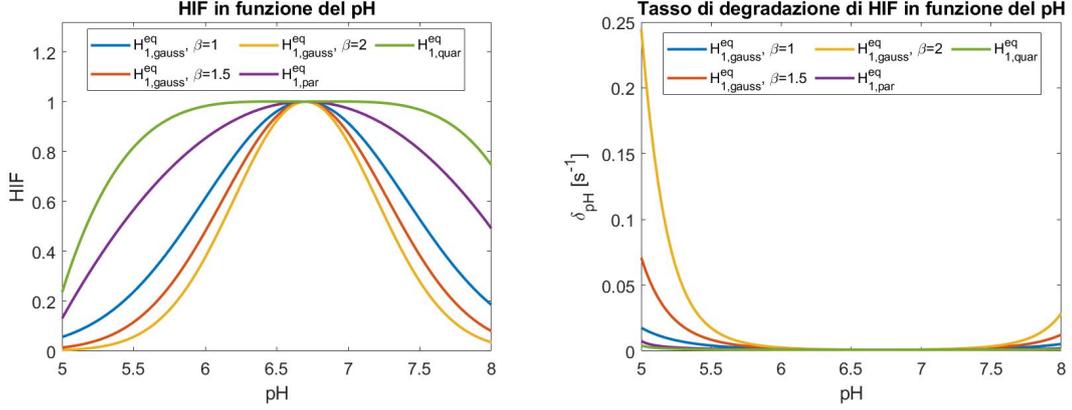
oppure una curva di quarto grado del tipo

$$H_{1,quar}^{eq} = q_1(pH - 6.7)^4 + q_2(pH - 6.7)^2 + q_3 \quad (2.18)$$

Ciascuna delle precedenti consente di ricavare una diversa funzione di degradazione per HIF1, attraverso la formula

$$\delta_{pH}(pH) = \frac{\gamma_1}{H_1^{eq}(pH)} \quad (2.19)$$

Le concentrazioni di HIF1 ipotizzate e le relative curve di degradazione in funzione del pH sono riportate nelle Figure 2.4a e 2.4b.



(a) Possibili curve per la concentrazione di HIF1 all'equilibrio in funzione del pH, con valore massimo in corrispondenza dell'ascissa 6.7.

(b) Funzioni di degradazione di HIF1 in relazione al pH, ottenute a partire dalla concentrazione H_1^{eq} tramite la relazione (2.19).

Figura 2.4: Andamenti delle possibili concentrazioni di HIF1 in funzione del pH e delle funzioni di degradazione che ne conseguono.

Come emerge sia dagli esperimenti in vitro in [5], sia dal modello matematico sviluppato in [21], il sistema (2.1) dovrebbe dare origine a un andamento di HIF1 con un punto massimo di espressione del fattore. Per localizzare il picco massimo all'equilibrio in modo analitico, si possono fare delle considerazioni a partire dal sistema allo stato stazionario, cioè

$$\begin{cases} \gamma_1 - \delta_{pH}(pH)H_1 - \delta_{12}^{ox}g_{12}(O_2)F_{12}(H_1)P_2 = 0 \\ \gamma_{21}\Gamma_2(H_1) - \delta_{P_2}P_2 = 0 \end{cases} \quad (2.20)$$

Se si deriva la prima equazione rispetto alla variabile orizzontale x si ricava l'espressione

$$\begin{aligned} & -\frac{d\delta_{pH}}{dpH}(pH)\frac{\partial pH}{\partial x}H_1 - \delta_{pH}(pH)\frac{\partial H_1}{\partial x} - \delta_{12}^{ox}\frac{dg_{12}}{dO_2}(O_2)\frac{\partial O_2}{\partial x}F_{12}(H_1)P_2 \\ & - \delta_{12}^{ox}g_{12}(O_2)\left[\frac{dF_{12}}{dH_1}(H_1)\frac{\partial H_1}{\partial x}P_2 + F_{12}(H_1)\frac{\partial P_2}{\partial x}\right] = 0 \end{aligned} \quad (2.21)$$

All'equilibrio, la concentrazione di PHD2 si può esprimere in funzione di quella di HIF1, secondo la formula ricavata in (2.6), come $P_2 = \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}}H_1$. Inoltre, poiché si vuole ottenere il punto dove HIF1 è massimo, quindi nel punto critico dove $\frac{\partial H_1}{\partial x} = 0$, la precedente relazione si può semplificare annullando tutti i termini che contengono la derivata di HIF1 lungo x , come segue

$$-\frac{d\delta_{pH}}{dpH}(pH)\frac{\partial pH}{\partial x}H_1 - \delta_{12}^{ox}\frac{dg_{12}}{dO_2}(O_2)\frac{\partial O_2}{\partial x}F_{12}(H_1)\frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}}H_1 = 0 \quad (2.22)$$

Quindi, escludendo il caso banale in cui $H_1 = 0$, la coordinata x in cui la concentrazione di HIF1 raggiunge il punto critico è quella che soddisfa la seguente relazione implicita

$$-\frac{d\delta_{pH}}{dpH}(pH)\frac{\partial pH}{\partial x} - \delta_{12}^{ox}\frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}}\frac{dg_{12}}{dO_2}(O_2)\frac{\partial O_2}{\partial x}F_{12}(H_1^{eq}) = 0 \quad (2.23)$$

dove, visto che si considera il sistema allo stato stazionario, si è assunto che la concentrazione H_1 sia quella all'equilibrio, calcolata precedentemente nella (2.9). La formula ottenuta è del tutto generale e restituisce risultati diversi se si considerano forme alternative delle funzioni coinvolte. In questo caso, si utilizzeranno le funzioni scelte in precedenza, quindi

$$g_{12}(O_2) = \frac{O_2}{K_{12}^{ox} + O_2} \quad (2.24)$$

$$F_{12}(H_1) = \frac{H_1}{K_{12} + H_1} \quad (2.25)$$

$$H^+(x) = \frac{(H_{int} - H_{ext})}{(1 - e^{-\sigma L})} (1 - e^{\sigma(x-L)}) + H_{ext} \quad (2.26)$$

$$pH(H^+) = -\log_{10}(H^+) \quad (2.27)$$

Inoltre si è imposta una funzione di degradazione ottenuta da una concentrazione di HIF1 di tipo gaussiano (2.16), cioè

$$\delta_{pH}(pH) = \frac{\gamma_1}{C + e^{-\beta(pH-6.7)^2}} \quad (2.28)$$

Per giungere ad un valore numerico dell'ascissa x_{max} in cui HIF1 raggiunge il valore massimo, è necessario, inoltre, ipotizzare una distribuzione dell'ossigeno all'equilibrio. In questo caso, essa è stata scelta pari alla soluzione stazionaria del problema bidimensionale (1.2) nel setting dell'esperimento 1, già calcolata nella sottosezione 1.3.1 e data da

$$c(x) = C_0 \frac{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}x} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}x}}{e^{\sqrt{\frac{\delta}{D}}L} + e^{-\sqrt{\frac{\delta}{D}}L}} \quad (2.29)$$

Per sostituzione delle precedenti funzioni (2.24)-(2.29) all'interno della relazione (2.23), se $\lambda = \sqrt{\frac{\delta}{D}}$, si ottiene la seguente equazione in forma implicita nella variabile x

$$\begin{aligned} & -\frac{2\beta\gamma_1(pH-6.7)e^{-\beta(pH-6.7)^2}}{(C + e^{-\beta(pH-6.7)^2})^2} \cdot \frac{\sigma(H_{int} - H_{ext})e^{\sigma(x-L)}}{\ln(10)(1 - e^{-\sigma L})H^+(x)} \\ & -\frac{\delta_{12}^{ox}\gamma_{21}}{\delta_{P_2}} \frac{K_{12}^{ox}}{(K_{12}^{ox} + O_2(x))^2} \cdot \frac{aC_0(e^{\lambda x} - e^{-\lambda x})}{e^{\lambda L} + e^{-\lambda L}} \frac{H_1^{eq}}{K_{12} + H_1^{eq}} = 0 \end{aligned} \quad (2.30)$$

che, al variare dei parametri e delle funzioni scelte, restituisce il valore dell'ascissa x_{max} dove la concentrazione di HIF1 è massima allo stato stazionario. I risultati di questa analisi saranno presentati e descritti nel dettaglio nella sezione successiva.

2.4 Risultati numerici

Per testare il modello matematico precedentemente descritto, sono state incluse le equazioni che modellano l'interazione tra HIF1 e PHD2 mediata dall'ossigeno, nella simulazione

numerica implementata nella sezione 1.4, che invece riproduceva solo la dinamica dell'ossigeno. I risultati numerici presentati in seguito sono stati ottenuti considerando il dominio tridimensionale assialsimmetrico, mostrato in Figura 1.3. Complessivamente, il sistema è costituito dall'equazione di diffusione e reazione dell'ossigeno (1.2) e dal sistema di due equazioni differenziali ordinarie (2.14), che descrivono la variazione di concentrazione di HIF1 e PHD2. Si assume, invece, che il pH abbia una distribuzione spaziale nel dominio costante in tempo. Per il setting sperimentale di Honda, per le motivazioni descritte nella sezione 2.3, è stata scelta una curva decrescente per la concentrazione di ioni idrogeno H^+ (2.10), da cui si ottiene un profilo crescente di pH lungo la coordinata x . Per i valori di bordo si è ipotizzato che il pH a contatto con l'ambiente esterno sia pari a 7.4, cioè quello fisiologico cellulare [23], mentre quello al centro del vetrino abbia valore 5. Da questi valori fissati, invertendo la relazione logaritmica che lega il pH alla concentrazione di ioni H^+ , $pH = -\log_{10}(H^+)$, si possono dedurre facilmente i valori di bordo della concentrazione di ioni idrogeno tramite la formula $H^+ = 10^{-pH}$, per cui $H_{ext} = 10^{-7.4}$ mM = $3.98 \cdot 10^{-8}$ mM e $H_{int} = 10^{-5}$ mM. Quindi i profili lungo x di ioni H^+ e di pH nella simulazione numerica sono rispettivamente quello riportato nella Figura 2.2a e quello nella 2.2b. Inoltre, assumendo che l'ambiente esterno sia in condizioni di normossia, si è ipotizzato che la concentrazione di ossigeno iniziale e al bordo sia del 21%, quindi che il parametro C_0 sia pari a 0.21 mM.

La formulazione di un modello matematico che si basa su un esperimento biologico richiede particolare attenzione ai parametri che devono essere coerenti con i valori riportati in letteratura. Per i coefficienti δ e D che caratterizzano l'assorbimento e la diffusione di ossigeno, come discusso in dettaglio nella sezione 1.4, sono stati utilizzati i valori $\delta = 5 \cdot 10^{-3}$ s $^{-1}$ e $D = 1.75 \cdot 10^{-5}$ cm 2 /s. Invece, per i parametri del sistema HIF1-PHD2 sono stati adottati i valori presenti in [21], eccetto che per la produzione di HIF1 γ_1 , che, come sottolineano diverse fonti tra cui [21], risulta abbastanza incerto. I valori adottati per i parametri del sistema HIF1-PHD2 sono riportati nella Tabella 2.1.

| Parametro | Valore | Fonte |
|--------------------|-----------------------------|-------|
| γ_1 | 1 μ M/s | – |
| δ_{12}^{ox} | 10^{-2} s $^{-1}$ | [21] |
| γ_{21} | $4 \cdot 10^{-5}$ s $^{-1}$ | [21] |
| δ_{P_2} | 10^{-5} s $^{-1}$ | [21] |
| K_{12}^{ox} | 100 μ M | [21] |
| K_{12} | 14 μ M | [21] |

Tabella 2.1: Parametri relativi al sistema HIF1-PHD2 (2.14).

In primo luogo, è interessante effettuare diverse simulazioni nel dominio dell'esperimento di Honda [5], al variare della funzione di degradazione δ_{pH} , per cercare di capire quale

delle tre funzioni (2.16), (2.17) o (2.18) sia più appropriata per riprodurre i risultati sperimentali. La prima funzione testata è la gaussiana $H_{1,gauss}^{eq}$ (2.16), in cui i parametri sono stati fissati in modo che la concentrazione massima di HIF1 si osservi in corrispondenza del valore di pH 6.7 e sia pari a $C + 1$. Questa restituisce una funzione di degradazione pH-dipendente pari a

$$\delta_{pH}^{gauss}(pH) = \frac{\gamma_1}{C + e^{-\beta(pH-6.7)^2}} \quad (2.31)$$

Al variare del parametro moltiplicativo β e fissata la costante $C = 10^{-3}$, si ricavano i risultati del sistema 2.14 in termini di concentrazione di HIF1, che sono riportati nella Figura 2.5a. Si può ripetere poi la simulazione cambiando solo la funzione δ_{pH} e considerando una concentrazione di HIF1 all'equilibrio di tipo parabolico $H_{1,par}^{eq}$ (2.17), con dei coefficienti tali che il massimo della concentrazione sia pari a $C + 1$, come per la funzione precedente, e cada nuovamente in corrispondenza di un pH pari a 6.7. Da quest'ultima segue una funzione di degradazione di HIF1 pH-dipendente del tipo

$$\delta_{pH}^{par}(pH) = \frac{\gamma_1}{p_1 pH^2 + p_2 pH + p_3} \quad (2.32)$$

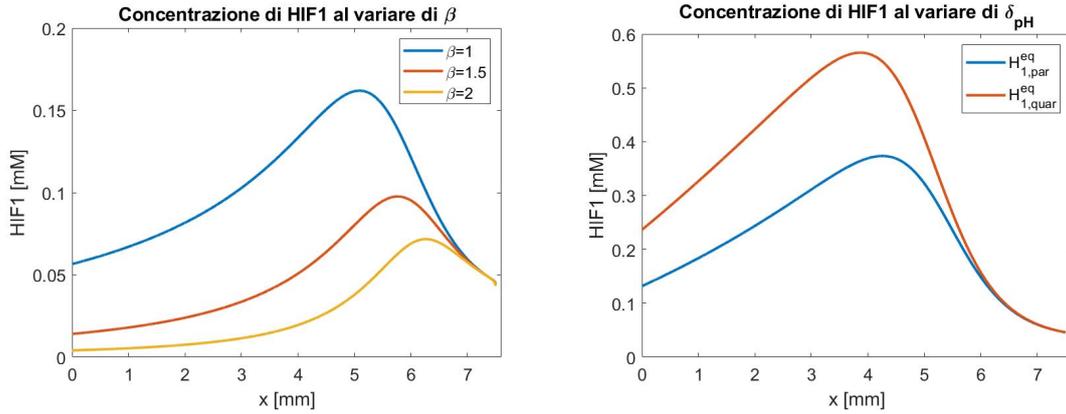
dove i coefficienti sono stati posti pari a $p_1 = -0.03$, $p_2 = 0.403$ e $p_3 = 1.25$. Analogamente con una curva di quarto grado del tipo $H_{1,quar}^{eq}$ (2.18) si ricava una funzione

$$\delta_{pH}^{quar}(pH) = \frac{\gamma_1}{q_1(pH - 6.7)^4 + q_2(pH - 6.7)^2 + q_3} \quad (2.33)$$

con $q_1 = -0.0057$, $q_2 = 6 \cdot 10^{-4}$ e $q_3 = 0.06$, scelti di nuovo in modo che la curva $H_{1,quar}^{eq}$ abbia le stesse caratteristiche delle precedenti in termini di valore massimo e ascissa in cui si osserva il picco. I risultati ottenuti con le ultime due funzioni di degradazione sono riportati nella Figura 2.5b.

Nelle successive simulazioni si sceglierà di adottare la funzione δ_{pH}^{gauss} che deriva dalla distribuzione gaussiana dell'HIF1 con coefficiente $\beta = 2$, sia per la regolarità della funzione e per il numero inferiore di coefficienti coinvolti, sia perché riproduce una concentrazione spaziale di HIF1 nel dominio più coerente qualitativamente con quella dell'esperimento in [5].

Dai risultati ottenuti nel setting di Honda per il sistema (2.14), con funzione di degradazione δ_{pH}^{gauss} , combinato con l'equazione di diffusione dell'ossigeno (1.2), si può osservare che la dinamica giunge allo stato stazionario dopo circa 4 ore. Ciò è coerente anche con quanto è riportato da diverse fonti in letteratura. Ad esempio, nel modello matematico sviluppato da Ferrante et al. in [21], la concentrazione di HIF1 giunge a un valore massimo dopo circa due ore e impiega lo stesso tempo per tornare al valore asintotico in ipossia. Ciò è coerente anche con gli esperimenti effettuati da Honda et al. in [5], in cui l'anello di concentrazione di HIF1 che si forma sul bordo del vetrino, mostrato in Figura 2.6 risulta statico dopo circa 3 ore.



(a) Concentrazione di HIF1 allo stato stazionario in funzione della coordinata orizzontale, ottenuta tramite la funzione di degradazione δ_{pH}^{gauss} , al variare del parametro β .

(b) Concentrazione di HIF1 allo stato stazionario in funzione della coordinata orizzontale, ottenuta tramite le funzioni di degradazione δ_{pH}^{par} per la curva blu e δ_{pH}^{quar} per quella rossa.

Figura 2.5: Confronto tra i grafici di concentrazione di HIF1 ottenuti allo stato stazionario con diverse funzioni di degradazione δ_{pH} .

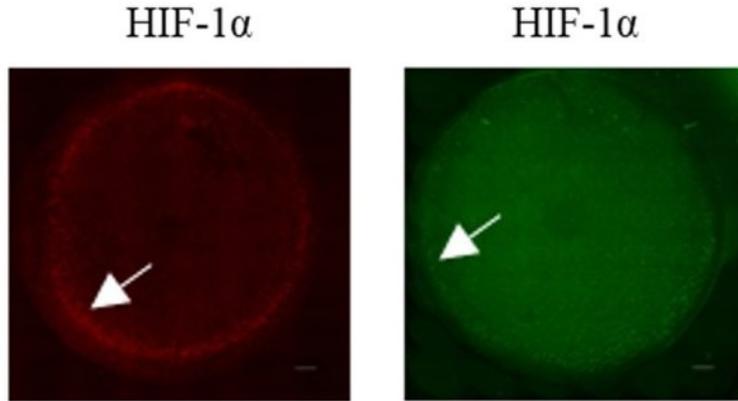
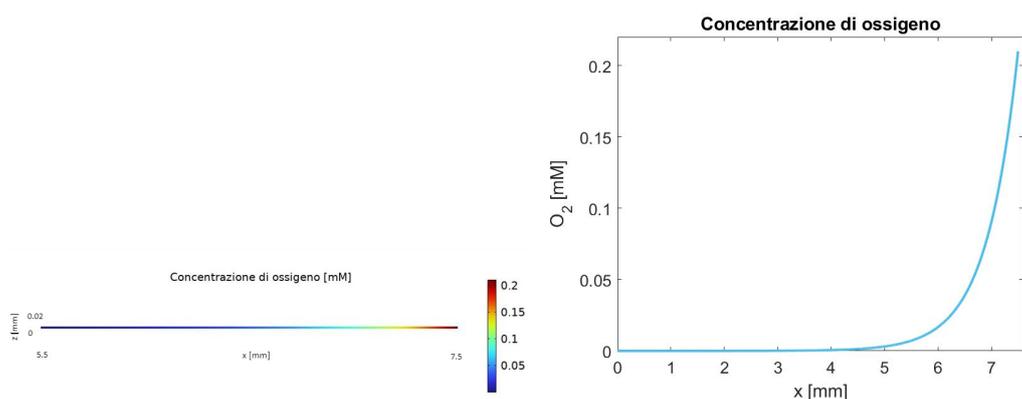


Figura 2.6: Concentrazione di HIF1 nelle cellule HK-2 a sinistra e HeLa a destra, misurata da Honda tramite ICC [5].

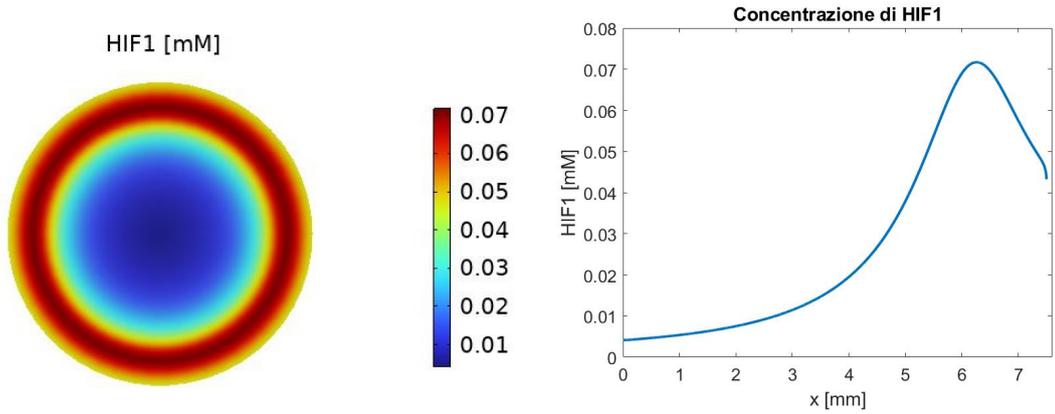
A partire dalla situazione iniziale in cui la percentuale di ossigeno è del 21% in tutti i punti del dominio, quando lo strato cellulare viene coperto dal vetrino, le cellule continuano ad assorbire ossigeno, che però può entrare solo dal bordo esterno dello strato di cellule a contatto con il liquido del pozzetto. Quindi l'assorbimento dell'ossigeno risulta molto più rapido rispetto alla diffusione dello stesso e già dopo pochi minuti la concentrazione di O_2 diventa molto bassa in quasi tutto il dominio, eccetto che nella zona più esterna. Dopo 20 minuti, il processo diffusivo dell'ossigeno raggiunge lo stato stazionario,

in cui la distribuzione di O_2 lungo la coordinata orizzontale x è data dalla curva crescente riportata in Figura 2.7b. Visto che il problema è simmetrico lungo la verticale, le variabili considerate non dipendono dalla coordinata verticale z , quindi il profilo di concentrazione di ossigeno è lo stesso per qualsiasi valore di z . Inoltre, fin dall'istante iniziale, la distribuzione di ossigeno e il profilo fissato di pH influenzano l'espressione di HIF1, quindi anche di PHD2. La concentrazione di fattore HIF1 ottenuta all'equilibrio coincide con quella nella (2.8) calcolata analiticamente e risulta bassa al centro e crescente fino a un picco massimo, come si vede nelle Figure 2.8a e 2.8b. In particolare, si registra un valore massimo di concentrazione di HIF1 in corrispondenza del punto in cui la concentrazione stazionaria di ossigeno è pari a 0.026 mM e il pH è di 5.7, cioè né al centro, dove la concentrazione di ossigeno è minima, né al bordo esterno, dove le cellule sono in normossia, ma in corrispondenza dell'ascissa $x = 6.26$ mm, dopo la quale la concentrazione di HIF1 decresce nuovamente. Allo stesso modo, la concentrazione stazionaria di PHD2 coincide con quella ricavata analiticamente nella (2.6) e presenta un picco e poi decresce verso il bordo, come riportato nella Figura 2.8c. Anche in questo caso, per la simmetria del problema, le concentrazioni di HIF1 e PHD2 non dipendono dalla coordinata verticale z .



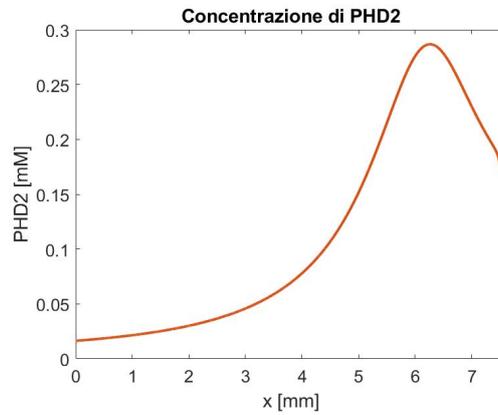
(a) Concentrazione di ossigeno all'equilibrio nel dominio rettangolare bidimensionale nel setting di Honda. (b) Concentrazione di ossigeno all'equilibrio in funzione della coordinata orizzontale x .

Figura 2.7



(a) Concentrazione di HIF1 all'equilibrio nel vetrino circolare.

(b) Concentrazione di HIF1 all'equilibrio in funzione della coordinata orizzontale x .



(c) Concentrazione di PHD2 all'equilibrio in funzione della coordinata orizzontale x .

Figura 2.8: Risultati numerici ottenuti nel setting di Honda, con i parametri della Tabella 2.1, dopo 4 ore.

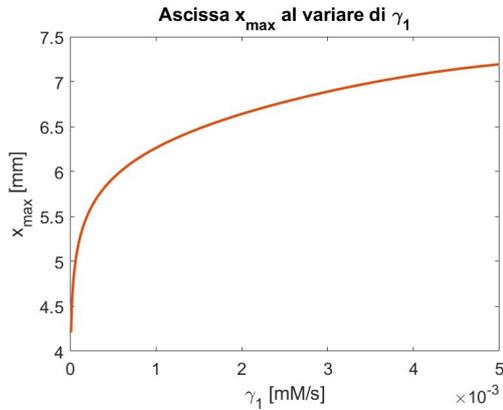
2.4.1 Analisi di sensitività al variare dei parametri

Spesso non tutti i valori dei parametri si possono reperire o calcolare con sufficiente accuratezza dai dati sperimentali disponibili e questo potrebbe avere un impatto significativo sulla validità del modello. Pertanto, è importante sfruttare l'approccio analitico descritto alla fine della sezione 2.3, per effettuare un'analisi di sensitività della soluzione stazionaria del sistema HIF1-PHD2 al variare dei parametri. A partire dall'equazione (2.30), si può vedere come si sposta il punto in cui HIF1 è massimo all'equilibrio, per diverse scelte dei parametri del modello γ_1 , δ_{12}^{ox} , δ_{P_2} e γ_{21} .

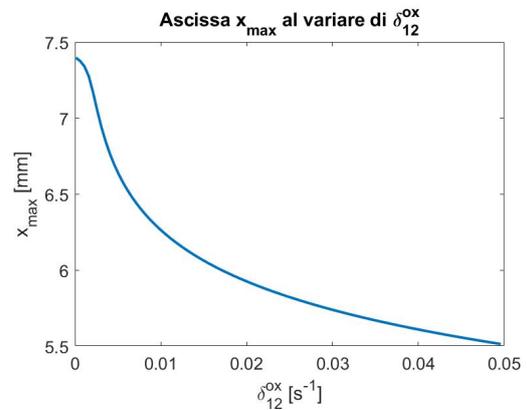
In primo luogo, se si modifica il valore del parametro di produzione γ_1 , si può osservare che al diminuire di γ_1 , il massimo si sposta verso il centro del vetrino, come è evidente dal grafico in Figura 2.9a, e il valore più alto raggiunto dalla concentrazione di HIF1 si

abbassa, come descritto in Figura 2.10a. Al contrario, invece, al diminuire del coefficiente di degradazione δ_{12}^{ox} , il punto di massimo si sposta verso il bordo del dominio, come si evince dalla Figura 2.9b, e assume valori sempre crescenti, come mostrato in Figura 2.10b. Inoltre, per il coefficiente di decadimento naturale di PHD2 δ_{P_2} , si può osservare che al decrescere del parametro si riduce anche la concentrazione massima di HIF1, rappresentata in Figura 2.10c, mentre il picco si sposta verso il centro, come si evince dalla Figura 2.9c.

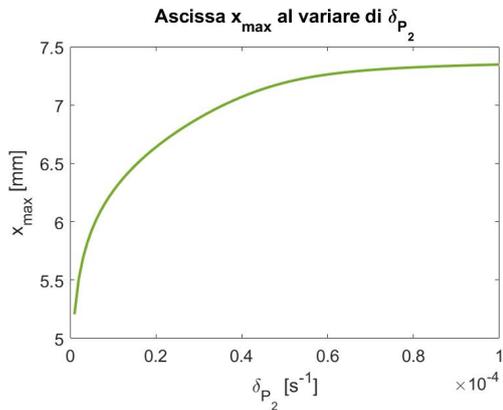
Un andamento opposto si registra al variare del parametro di produzione di PHD2 γ_{21} , per cui se γ_{21} diminuisce, il picco di HIF1 si sposta verso il bordo del dominio, come mostrato in Figura 2.9d, mentre il valore della concentrazione massima di HIF1 aumenta, come risulta dalla Figura 2.10d. Infine, nella Figura 2.11 si riporta l'andamento complessivo dell'ascissa x_{max} , dove è raggiunto il massimo valore di HIF1, al variare di tutti i parametri coinvolti.



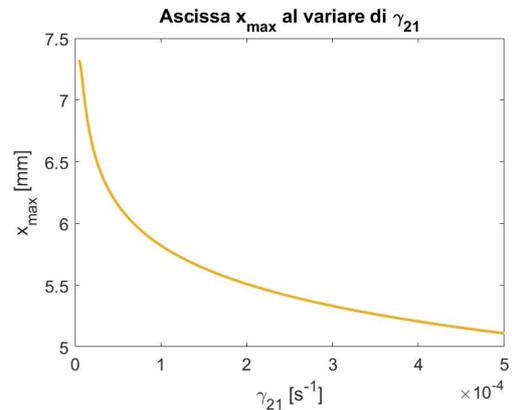
(a) Ascissa in cui HIF1 raggiunge il valore massimo al variare di γ_1 .



(b) Ascissa in cui HIF1 raggiunge il valore massimo al variare di δ_{12}^{ox} .



(c) Ascissa in cui HIF1 raggiunge il valore massimo al variare di δ_{P_2} .



(d) Ascissa in cui HIF1 raggiunge il valore massimo al variare di γ_{21} .

Figura 2.9: Valore dell'ascissa x_{max} , in cui HIF1 raggiunge il valore massimo, al variare dei parametri del modello in un range attorno al valore di riferimento della Tabella 2.1.

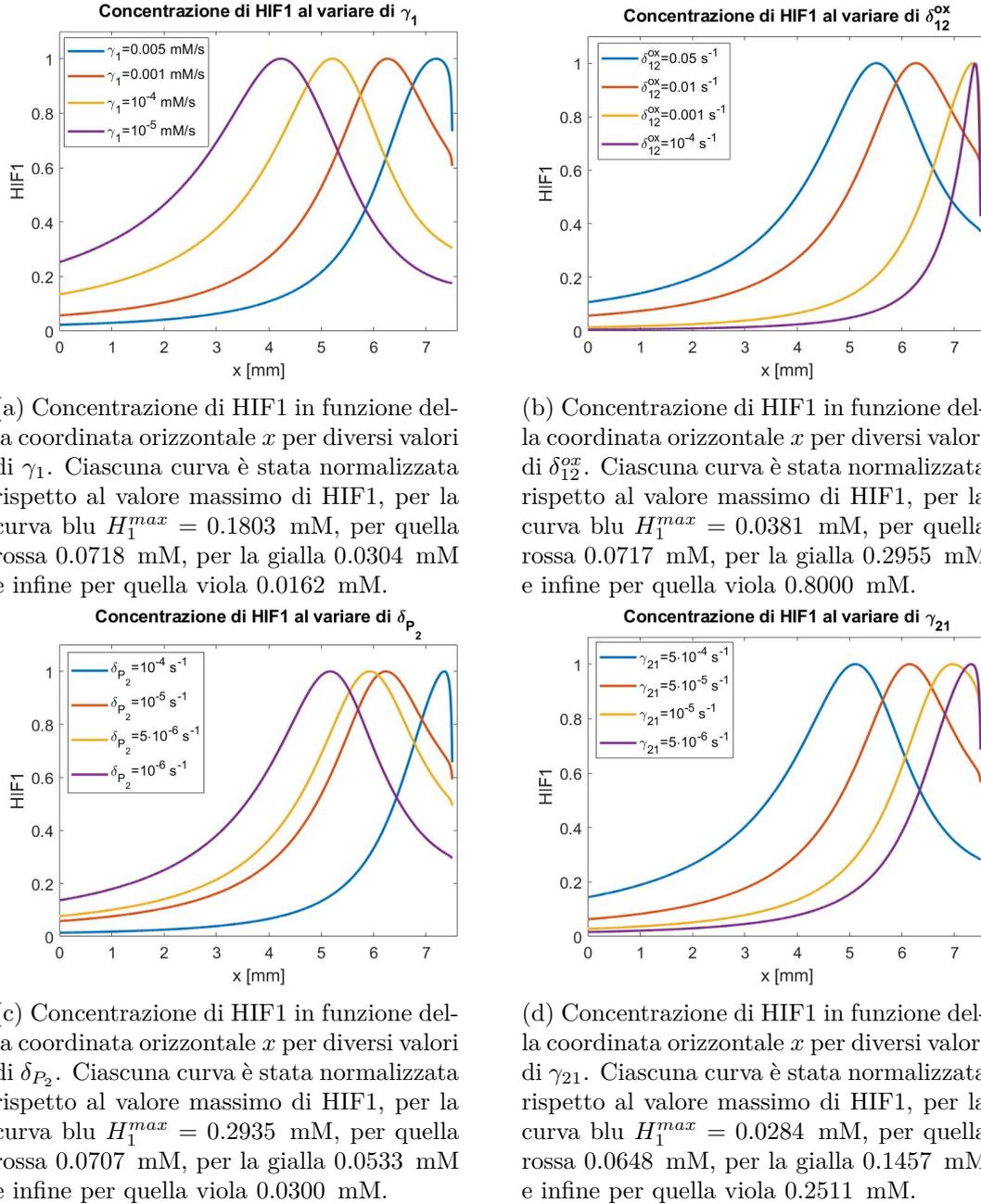


Figura 2.10: Andamento della concentrazione di HIF1 nel dominio dell'esperimento di Honda, adimensionalizzata rispetto al valore massimo H_1^{max} , al variare dei parametri del modello.

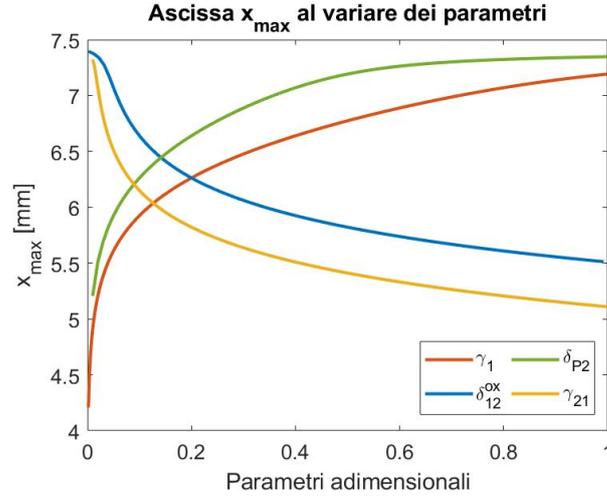


Figura 2.11: Andamento dell'ascissa x_{max} in cui HIF1 raggiunge il picco, al variare dei quattro parametri resi adimensionali riscalandoli rispetto al valore massimo considerato, che per ciascun parametro è dato dai seguenti valori: $\gamma_1^{max} = 5 \mu\text{M/s}$, $\delta_{12}^{ox,max} = 0.05 \text{ s}^{-1}$, $\delta_{P2}^{max} = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $\gamma_{21}^{max} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

2.4.2 Variazioni della concentrazione esterna di ossigeno

Per testare il modello e confrontare qualitativamente i risultati ottenuti con quelli dell'esperimento di Honda [5], si possono mettere a confronto le concentrazioni di HIF1 ottenute dalla simulazione precedente con quelle dell'esperimento per diverse concentrazioni di ossigeno esterno, che sono riportate nella Figura 2.12. Infatti, in [5], vengono quantificati gli effetti della variazione di concentrazione ossigeno esterna, in termini di distanza del picco di HIF1 dal bordo a contatto con l'ambiente esterno. In particolare, dalle prove in vitro risulta che più si riduce il livello di ossigeno nell'ambiente esterno, più il fattore HIF1 risulta sovraespresso nella regione prossima al bordo. Dalle simulazioni effettuate adottando nuovamente i parametri della Tabella 2.1, si ricava un andamento analogo della concentrazione di HIF1, perché al diminuire della concentrazione esterna di ossigeno C_0 , l'anello dove HIF1 è massimo si avvicina al bordo esterno del vetrino. Inoltre, il valore massimo di HIF1 cresce al diminuire della disponibilità di ossigeno, coerentemente con il fatto che la molecola HIF1 è sovraespressa in assenza di ossigeno. Il comportamento appena descritto si può osservare nella Figura 2.13, dove è rappresentata la concentrazione di HIF1 ottenuta nel dominio bidimensionale in forma di anello, e nella Figura 2.14, dove è riportata la concentrazione di HIF1 lungo l'ascissa x per le diverse concentrazioni di ossigeno esterno.

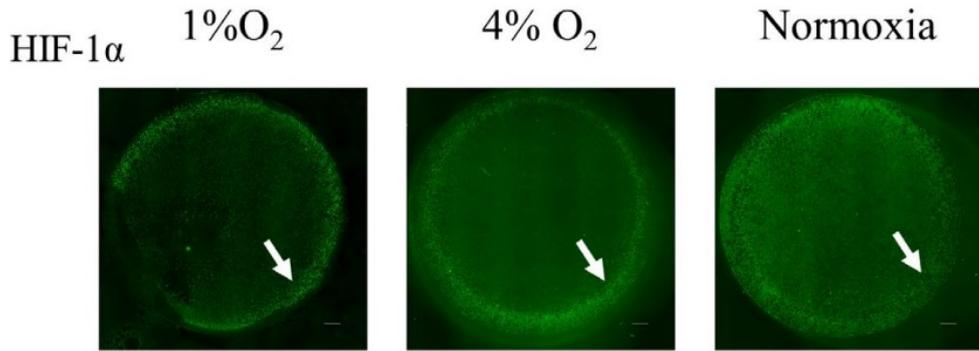


Figura 2.12: Risultati sperimentali ottenuti in vitro da Honda [5] per diverse concentrazioni esterne di ossigeno.

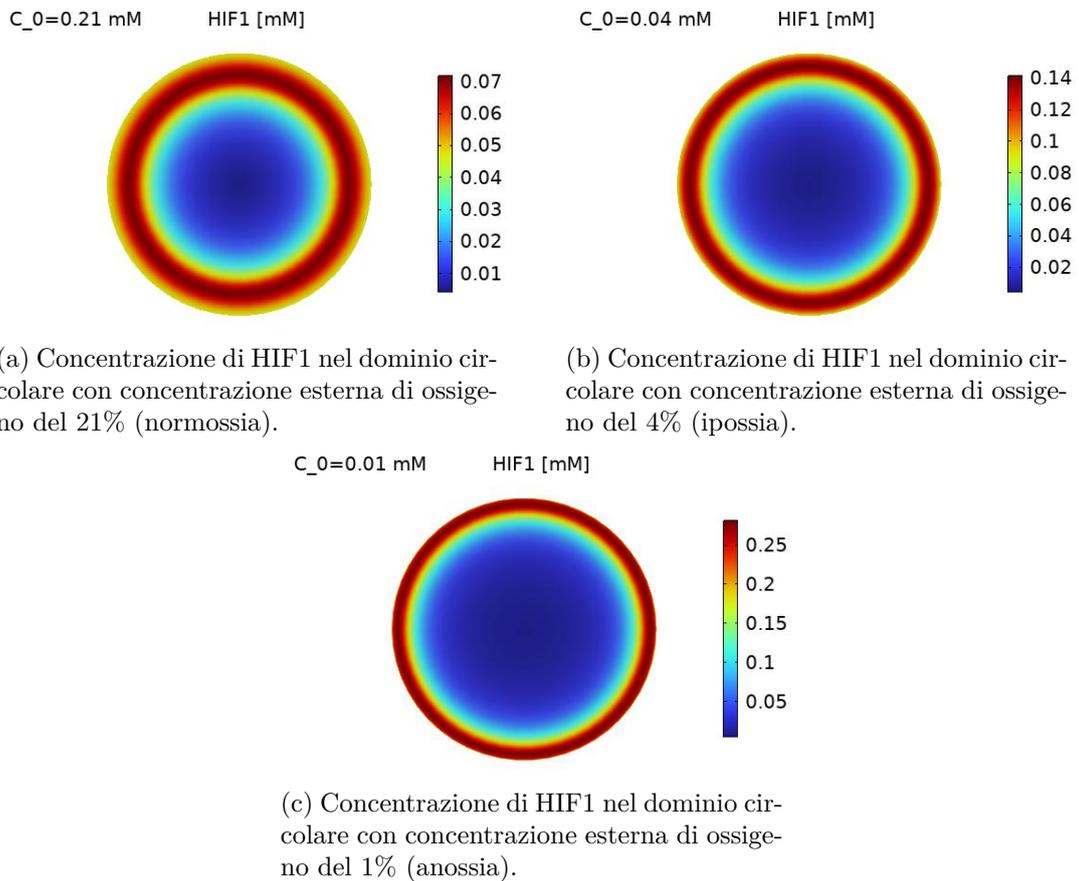


Figura 2.13: Concentrazione stazionaria di HIF1 per diverse concentrazioni di ossigeno esterno nel setting di Honda.

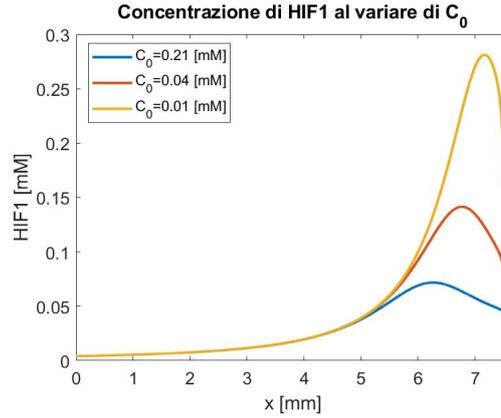
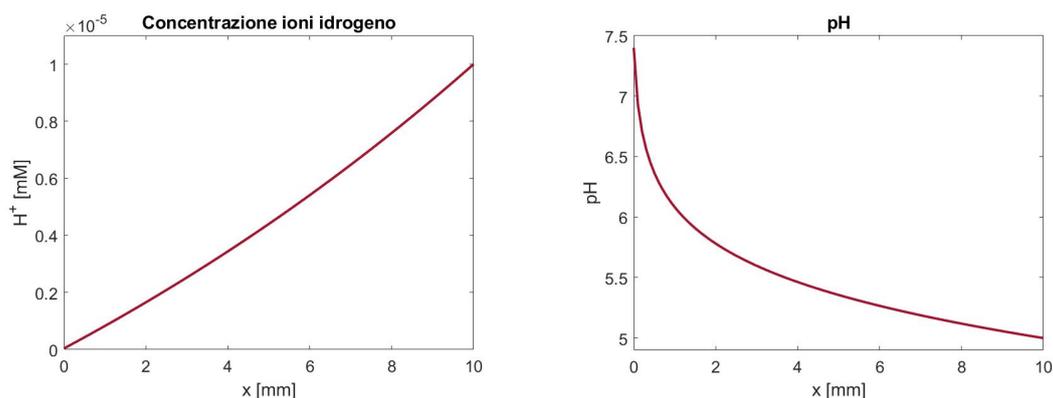


Figura 2.14: Risultati numerici per la concentrazione stazionaria di HIF1 lungo una sezione del dominio rettangolare al variare della concentrazione esterna e iniziale C_0 nel setting dell'esperimento 1.

2.4.3 Esperimento 2

A partire dalla simulazione numerica effettuata per l'esperimento di Honda, sono stati ricavati risultati anche nel setting sperimentale di Arocena [10], seppure le soluzioni in termini di HIF1 non possono essere confrontate con le osservazioni in vitro, perché in [10] non sono riportate misurazioni di HIF1. In questo caso, l'unica fonte di ossigeno è il foro centrale nel disco superiore del vetrino, quindi le zone più soggette a ipossia sono quelle ai bordi esterni del dominio. L'assetto sperimentale è diverso, ma in entrambi i casi l'acidità aumenta dove c'è meno ossigeno. Infatti, come risulta dai dati ottenuti in vitro da Arocena in [10], il pH è più acido ai bordi, dove l'ossigeno è in concentrazioni minori. Per questo motivo, non si può adottare la stessa curva del caso precedente per la concentrazione di ioni idrogeno, riportata in Figura 2.2a, ma si deve invertire l'andamento. Uno dei modi possibili è scambiare i valori di pH esterno e interno fissati, così che quello esterno sia più acido di quello interno, e adottare la stessa espressione analitica per la concentrazione di H^+ , quindi la (2.10). Da questa, poi, si può dedurre il pH come nel caso precedente, attraverso l'equazione $pH = -\log_{10}(H^+)$. Quindi, si è imposta una concentrazione di ioni idrogeno al bordo esterno pari a $H_{ext} = 10^{-5}$ mM, in modo che il pH esterno sia 5, e al bordo interno $H_{int} = 3.98 \cdot 10^{-8}$ mM, così che il pH interno sia quello fisiologico corrispondente a 7.4. In questo modo si ricavano gli andamenti riportati nelle Figure 2.15a e 2.15b, rispettivamente per la concentrazione di ioni H^+ e per il pH.

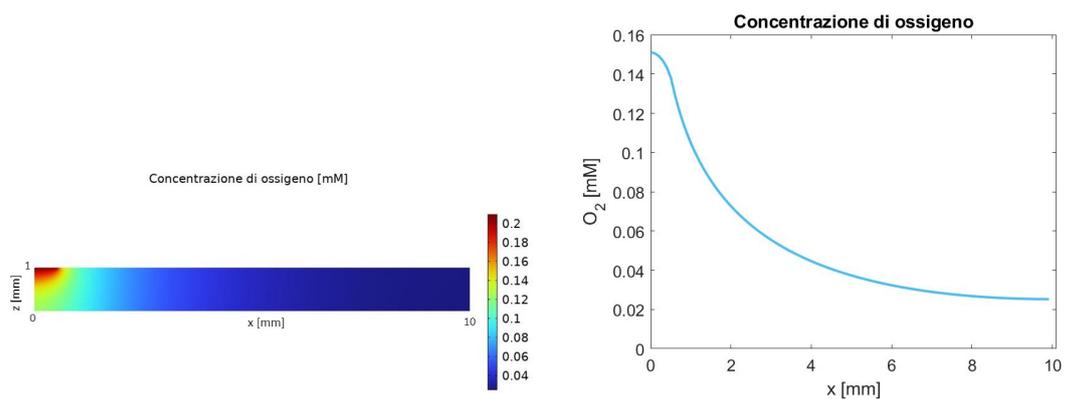
In primo luogo, adottando per i coefficienti di diffusione e assorbimento dell'ossigeno gli stessi valori descritti nella sezione 1.4, si può osservare che la concentrazione di ossigeno raggiunge lo stato stazionario dopo circa 10 ore. In generale, essa non è costante lungo l'asse verticale e, come si vede nella Figura 2.16a, è maggiore vicino alla fonte di ossigeno situata in alto a sinistra. Attraverso una media verticale, si può ricavare l'andamento della concentrazione di O_2 lungo la coordinata orizzontale x , che è riportata in Figura 2.16b.



(a) Concentrazione di ioni idrogeno, lungo una sezione orizzontale che si estende dal centro, $x = 0$, al bordo, $x = L$, del vetrino con $\sigma = 50$.

(b) Andamento del pH lungo una sezione orizzontale che si estende dal centro al bordo del vetrino.

Figura 2.15: Grafici della concentrazione di ioni idrogeno e del pH nel setting dell'esperimento 2.



(a) Concentrazione di ossigeno all'equilibrio nel dominio rettangolare bidimensionale nel setting di Arocena.

(b) Concentrazione di ossigeno all'equilibrio mediata lungo la verticale in funzione della coordinata orizzontale x .

Figura 2.16

In secondo luogo, sono stati ottenuti i risultati in termini di HIF1 e PHD2 con i parametri della Tabella 2.1. Il sistema raggiunge lo stato stazionario dopo circa 24 ore e anche in questo caso la concentrazione delle variabili coinvolte varia lungo l'asse verticale. In generale, si può osservare lo stesso trend dell'esperimento 1, cioè un picco nella concentrazione di HIF1 e PHD2 vicino alla regione a contatto con l'ambiente esterno. Come nel setting di Honda, il caratteristico andamento di HIF1 non è dovuto solo all'azione dell'ossigeno, ma anche al contributo del pH, che esercita un'azione di degradazione

indipendente, modellata dalla funzione di degradazione δ_{pH}^{gauss} del tipo (2.31), dove si è imposto nuovamente $C = 10^{-3}$ e $\beta = 2$. Le concentrazioni medie verticali di HIF1 e PHD2 sono riportate rispettivamente nelle Figure 2.17b e 2.17c, mentre nella Figura 2.17a si mostra la concentrazione di HIF1 nel disco, che però non è misurata sperimentalmente in [10].

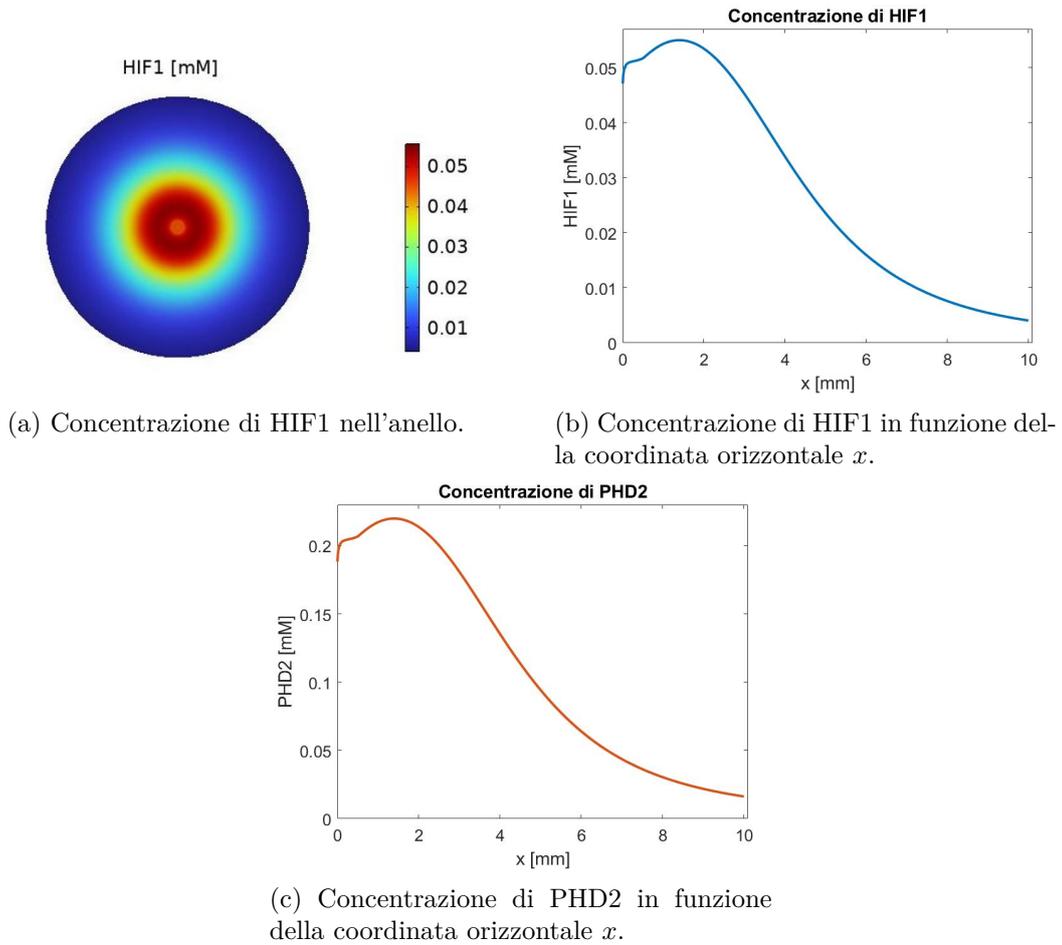


Figura 2.17: Risultati numerici ottenuti nel setting di Arocena, con i parametri della Tabella 2.1, dopo 24 ore.

Anche in questo caso si osserva che al diminuire della concentrazione esterna di ossigeno C_0 , la condizione di ipossia nel dominio diventa più severa e il picco di HIF1 risulta più pronunciato, come si mostra nelle Figure 2.18 e 2.19, anche se, come anticipato in precedenza, in letteratura non sono disponibili dati relativi alla concentrazione di HIF1 in questo setting.

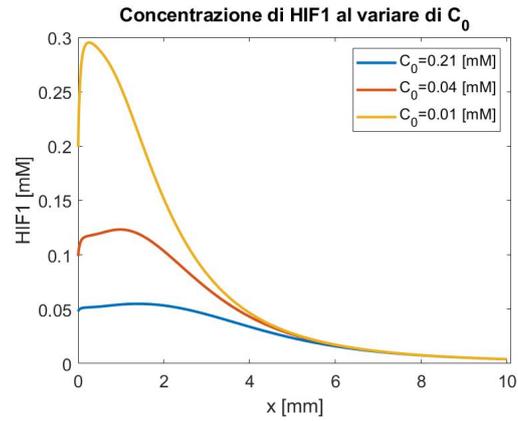
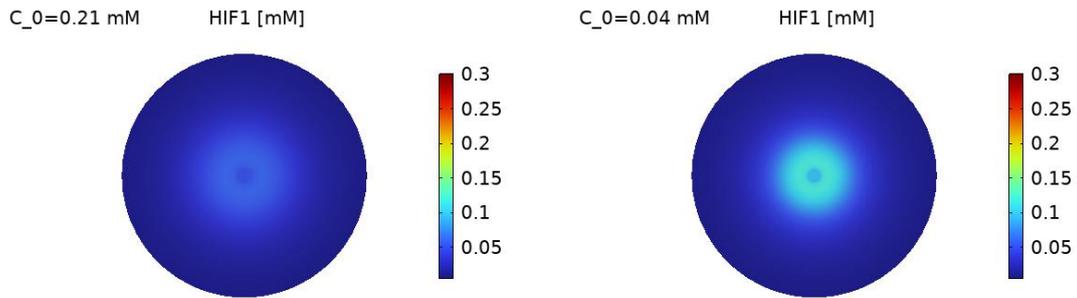
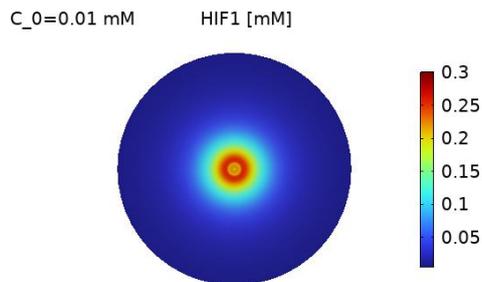


Figura 2.18: Concentrazione stazionaria di HIF1 lungo una sezione del dominio rettangolare al variare della concentrazione esterna e iniziale C_0 .



(a) Concentrazione di HIF1 nel dominio circolare con concentrazione esterna di ossigeno del 21% (normossia).

(b) Concentrazione di HIF1 nel dominio circolare con concentrazione esterna di ossigeno del 4% (ipossia).



(c) Concentrazione di HIF1 nel dominio circolare con concentrazione esterna di ossigeno del 1% (anossia).

Figura 2.19: Concentrazione stazionaria di HIF1 nel vetrino circolare per diverse concentrazioni di ossigeno esterno nel setting di Arocena.

Capitolo 3

Influenza dell'ipossia sul metabolismo cellulare

Lo stato di ipossia influenza notevolmente il metabolismo cellulare, con conseguenti effetti anche sull'acidità dell'ambiente e, quindi, sulle funzioni e sulla vita delle cellule. A tal proposito, risulta interessante sviluppare un modello matematico che riproduca la relazione tra la concentrazione di HIF1, che dipende dal livello di ipossia, quella dei principali elementi che intervengono nel metabolismo anaerobico della cellula e il pH.

3.1 Il processo biologico

Il metabolismo cellulare consiste in una complessa serie di reazioni biochimiche che avvengono nella cellula e che consentono la produzione delle molecole e dell'energia necessarie al sostentamento della cellula stessa. L'intero processo coinvolge un elevato numero di componenti chimiche e biologiche e diversi enzimi, responsabili della catalizzazione di alcune reazioni. In generale, la cellula è in grado di ricavare energia sotto forma di molecole di ATP, attraverso quella che è chiamata respirazione cellulare, a partire da diversi nutrienti, tra i quali i principali sono ossigeno e glucosio. La prima fase del processo metabolico prende il nome di glicolisi e non necessita di ossigeno, quindi ha luogo sia in caso di ipossia che di normossia. Essa consiste in una serie di 10 reazioni catalizzate enzimaticamente, con cui una molecola di glucosio è trasformata in due di piruvato e due di ATP. In primo luogo, la molecola di glucosio entra all'interno del citoplasma attraverso la membrana plasmatica, ma non può attraversarla per diffusione perché è polare e possiede un peso molecolare troppo grande. Tuttavia, il glucosio riesce a entrare nel citoplasma abbastanza liberamente attraverso il meccanismo della diffusione facilitata. Essa è anche definita diffusione mediata da un trasportatore, in quanto avviene tramite l'azione di proteine trasportatrici. Nel caso del glucosio, le proteine di membrana deputate al trasporto sono i trasportatori GLUT, che a loro volta sono sensibili alla concentrazione di HIF1. La prima reazione che avviene nella cellula è la fosforilazione del glucosio in glucosio-6-fosfato, che generalmente è molto rapida. Segue poi una catena di reazioni in cui il glucosio-6-fosfato si trasforma in fruttosio-6-fosfato, che a sua volta diventa fruttosio-1,6-bisfosfato. Attraverso

le reazioni successive, che sono elencate nella Figura 3.1, si giunge alla produzione di due molecole di piruvato, con cui si conclude il processo di glicolisi.

In presenza di ossigeno, il piruvato prodotto dalla glicolisi viene trasportato nei mitocondri e ossidato in acetyl-CoA. Successivamente, ha inizio il ciclo di Krebs nei mitocondri, dove, attraverso la fosforilazione ossidativa, la cellula produce altre molecole di ATP. Complessivamente, le vie aerobiche consentono la produzione di 30-38 molecole di ATP per molecola di glucosio [24]. In assenza di ossigeno, invece, non può avere luogo la fosforilazione ossidativa e il piruvato non è trasportato nei mitocondri, ma resta nel citoplasma e viene trasformato in acido lattico, che a sua volta si dissocia in lattato e ioni idrogeno. Nel caso ipossico, quindi, la cellula riesce a produrre solo 2 molecole di ATP per ogni molecola di glucosio e, per effettuare nuovamente la glicolisi, deve riconvertire il NADH in NAD⁺ e questo è reso possibile proprio dalla reazione che porta alla produzione di acido lattico. Esso è prodotto con la glicolisi e può attraversare la membrana plasmatica grazie all'azione dei trasportatori MCT. In particolare, il trasportatore MCT4, che è stimolato dalla presenza di HIF1 e quindi dall'ipossia [25], è responsabile del passaggio dal citoplasma all'ambiente extracellulare, mentre MCT1 del trasporto opposto. La produzione di quantità eccessive di acido lattico nell'ambiente cellulare provoca un abbassamento del pH, con conseguenze sulla fisiologia e sulla vita delle cellule. Per limitare l'acidità del citoplasma, esse rispondono anche attraverso quelli che sono chiamati sistemi tampone, i quali sono costituiti da una coppia coniugata acido-base che si lega a uno ione H⁺ o OH⁻ a seconda di quale si trovi in eccedenza nel citoplasma. In questa maniera, si limita la concentrazione libera dello ione in eccesso, con conseguente aumento o diminuzione del pH, e si riduce la variazione complessiva di pH rispetto a quello di partenza. Ad esempio, un sistema tampone è quello del bicarbonato, che agisce in modo tale che quando gli ioni H⁺ aumentano, vengono legati alle molecole di HCO₃⁻ per formare CO₂, la quale può diffondere liberamente all'esterno della cellula. Le trasformazioni principali del metabolismo cellulare appena descritte sono schematizzate nella Figura 3.2, dove si riporta sia l'ingresso del piruvato nei mitocondri, sia la trasformazione del piruvato in lattato, che avviene attraverso l'enzima LDH-A, regolato da uno dei geni target di HIF.

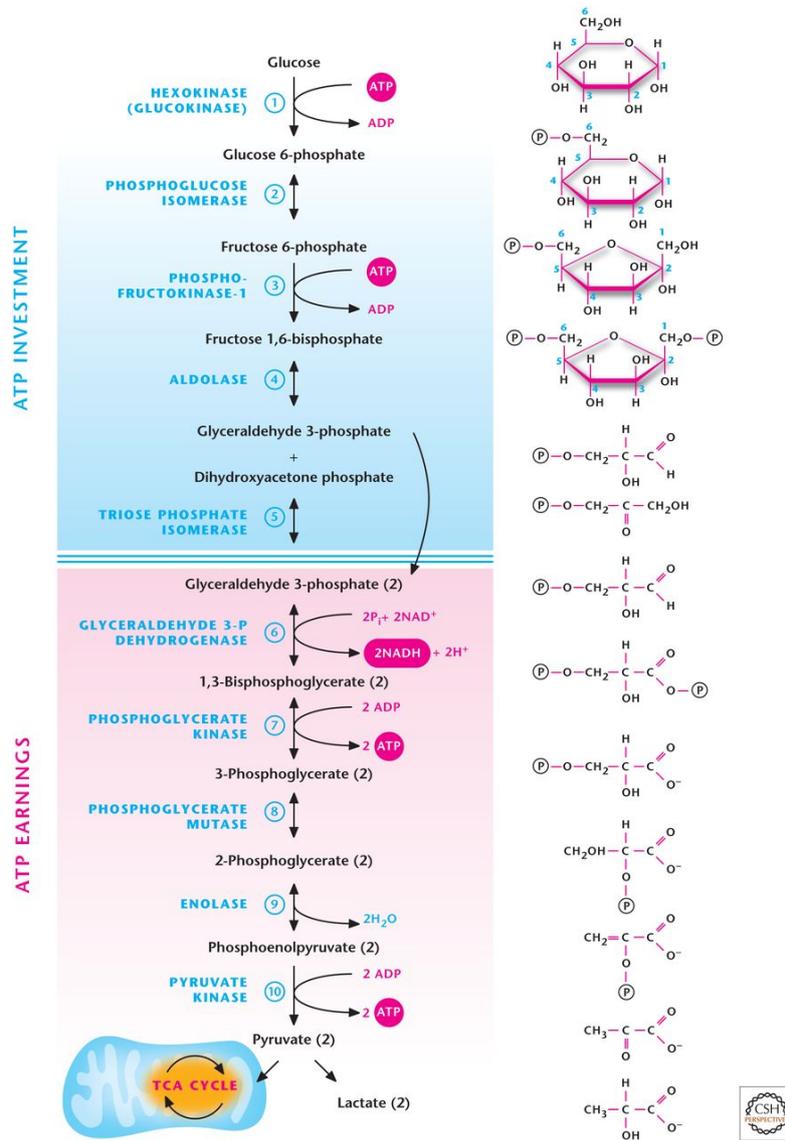


Figura 3.1: Schematizzazione delle reazioni che costituiscono il processo di glicolisi [26].

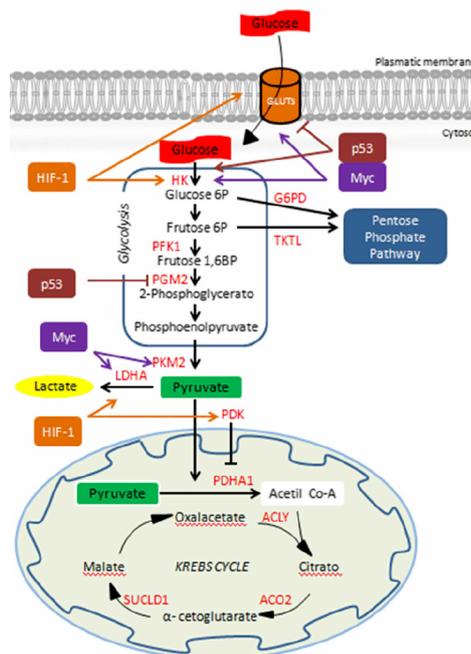


Figura 3.2: Schematizzazione delle principali reazioni che costituiscono il processo metabolico cellulare [27].

3.2 Alcuni modelli in letteratura

In letteratura sono presenti diversi modelli matematici che simulano il fenomeno del metabolismo cellulare aerobico o anaerobico, ma raramente includono la concentrazione del fattore HIF1. Trattandosi di un meccanismo biologico estremamente complesso, ciascuno dei modelli si basa su una semplificazione del metabolismo cellulare e si sofferma maggiormente su alcuni aspetti dell'intero processo. Ad esempio, nel lavoro di Chignola e Milotti [28], si propone un modello di ODE che include il glucosio e il relativo trasporto all'interno e all'esterno della cellula, ma trascura piruvato e lattato, il quale è quantificato solo attraverso un rate di produzione dell'acido lattico. Poiché il precedente modello si focalizza molto sulla prima fase del metabolismo cellulare, è stato esteso dagli stessi autori in lavori successivi [29], [30], dove si tiene conto anche della concentrazione di lattato, del suo trasporto attraverso la membrana cellulare e della variazione di concentrazione di ioni idrogeno. Inoltre, si considera la dinamica di ioni idrogeno, ioni bicarbonato e anidride carbonica, in relazione alla disponibilità di ossigeno e alle variazioni di pH nella cellula. Un altro modello matematico che schematizza il processo metabolico della cellula con un sistema di ODE è quello di Bocharov et al. [19], in cui gli autori selezionano 16 elementi rilevanti nella dinamica metabolica e ne deducono le evoluzioni temporali a partire dalle trasformazioni chimiche e biologiche. Una particolarità del sistema precedente è che include direttamente la presenza della molecola HIF1 e della PHD, ma non vengono direttamente prese in esame le influenze del metabolismo sul pH cellulare.

Inoltre, sono stati elaborati altri modelli in cui si analizzano un numero minore di variabili, ma si considera anche la loro evoluzione in spazio e non solo in tempo. Ad esempio, quello di Wang et al. in [12], prevede equazioni di reazione e diffusione per glucosio e lattato esterni ed interni, che dipendono dai potenziali chimici delle molecole coinvolte nei processi di trasporto attraverso la membrana cellulare. Ulteriori studi, come ad esempio quello di Phipps et al. [31] e di McGillen et al. [32], includono equazioni di reazione e diffusione per le concentrazioni di ossigeno, glucosio e lattato, regolate da tassi di assorbimento in [31] e da funzioni switch in [32], a seconda delle condizioni di ipossia, anossia, carenza di glucosio e acidosi. Anche il modello di Robertson-Tessi et al. [33] è basato su equazioni di diffusione per ossigeno, glucosio e pH extracellulare che evolvono in base a tassi di produzione opportunamente stimati.

Tra i modelli matematici più recenti si può citare quello di Spinicci et al. [34], in cui si mette in relazione un sistema di quattro equazioni differenziali ordinarie, che regolano la concentrazione di HIF1 e altri fattori di trascrizione, a un sistema di tre equazioni alle derivate parziali, che descrivono la dinamica di ossigeno, glucosio e ioni idrogeno. Un ulteriore modello matematico molto recente è quello di Jacquet e Stéphanou, riportato in [35], in cui le variabili considerate per descrivere il metabolismo cellulare sono le concentrazioni di glucosio, ossigeno, ATP e piruvato. Tramite opportune funzioni di assorbimento, il precedente modello riesce a riprodurre alcuni meccanismi caratteristici del processo biologico: la carenza di ossigeno incrementa il consumo di glucosio, mentre l'aumento dell'acidità dell'ambiente riduce l'attività degli enzimi coinvolti nella glicolisi con conseguente aumento della concentrazione di glucosio.

3.3 Il modello matematico

Alla luce dei precedenti studi riguardo il metabolismo cellulare, è stato elaborato un sistema di equazioni alle derivate ordinarie che semplifichi e sintetizzi alcune delle reazioni metaboliche fondamentali in carenza di ossigeno. In ipossia, infatti, le cellule non dispongono dell'ossigeno necessario per svolgere la fosforilazione ossidativa, quindi producono energia per via anaerobica attraverso la sola glicolisi. Inoltre, le cellule di tumori solidi in fase di progressione, come quelle utilizzate negli esperimenti in vitro di riferimento, [5] e [10], sono spesso ipossiche, anche se, in diversi casi, si possono sviluppare condizioni di ipossia in cellule non tumorali. Ad esempio, quando la riduzione di ossigeno è dovuta a una reazione infiammatoria oppure, nelle cellule muscolari, se sottoposte a sforzo fisico intenso.

Sulla base delle precedenti considerazioni, si è optato per un modello matematico che schematizzi la via metabolica anaerobica, come rappresentato nella Figura 3.3, per analizzare gli effetti dell'espressione di HIF1 sul pH interno cellulare.

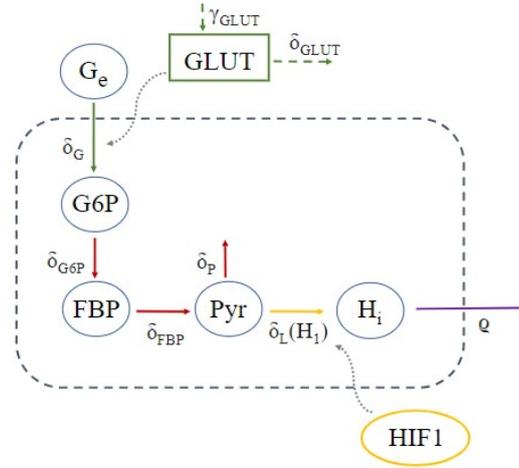


Figura 3.3: Schematizzazione del metabolismo anaerobico cellulare nel modello sviluppato.

Le conseguenze dell'ipossia sulle concentrazioni del fattore HIF1 e degli enzimi PHD2 sono modellate matematicamente attraverso il sistema di equazioni (2.1), già descritto ampiamente nel capitolo 2. In questo caso, si pone l'attenzione sull'influenza di HIF1 sull'acidità dell'ambiente, quindi la variabile H_1 risente solo degli effetti della carenza di ossigeno e non di quelli del pH, il cui profilo tempo-dipendente è calcolato attraverso il presente modello. Si considera, poi, un'equazione per la concentrazione di GLUT, che è responsabile della diffusione facilitata di glucosio attraverso la membrana cellulare ed è regolata anch'essa dal fattore HIF1. In particolare, la concentrazione del trasportatore è stimolata dalla presenza del fattore HIF1 e aumenta con un rate di produzione γ_{GLUT} , mentre diminuisce con un rate di eliminazione δ_{GLUT} , per cui

$$\frac{dGLUT}{dt} = \gamma_{GLUT}H_1 - \delta_{GLUT}GLUT \quad (3.1)$$

Anche il glucosio è incluso esplicitamente nel modello matematico, sotto forma di glucosio esterno e glucosio-6-fosfato, cioè quello che è già andato incontro ad una reazione di fosforilazione. Il primo, rappresentato dalla variabile G_e , è presente sul fondo di coltura delle cellule, quindi la sua concentrazione aumenta secondo una costante Γ , che simula il flusso proveniente dal substrato scelto per l'esperimento. Allo stesso tempo, il glucosio esterno entra nella cellula attraverso la membrana plasmatica, grazie all'azione del trasportatore GLUT e viene trasformato così in glucosio interno. Come descritto nella sezione 3.1, il trasporto risente della differenza di concentrazione di glucosio tra esterno e interno ed è mediato dal trasportatore attivo GLUT. Come riportato da diversi modelli in letteratura, ad esempio [12] e [36], si può considerare un termine di flusso uscente di glucosio di tipo Michaelis-Menten, che abbia al numeratore la differenza tra la concentrazione di glucosio esterna e quella interna, come nella seguente relazione

$$G_{e \rightarrow i} = \frac{G_e - G_i}{(K_{G_e} + G_e)(K_{G_i} + G_i)} \quad (3.2)$$

Visto che, in condizioni normali, una volta raggiunto il citoplasma, il glucosio viene subito fosforilato e trasformato in glucosio-6-fosfato, che non può più essere trasportato all'esterno della membrana cellulare, si può trascurare il flusso di glucosio dall'interno all'esterno della cellula. Quindi, in questa sede, si è scelto di semplificare la precedente espressione ed evitare così di studiare esplicitamente anche la concentrazione di glucosio interno, che aggiungerebbe al modello ulteriori parametri difficili da reperire. Pertanto, si è scelto un termine di flusso di tipo Michaelis-Menten semplificato, della seguente forma

$$G_{e \rightarrow i} = \frac{G_e}{K_G + G_e} \quad (3.3)$$

Sempre in virtù della rapidità della fosforilazione, è possibile trascurare la concentrazione di glucosio interno e modellare il processo di fosforilazione del glucosio, che porta alla produzione di G6P, cioè il glucosio-6-fosfato. Per ridurre il numero delle equazioni e delle variabili coinvolte, sono state considerate esplicitamente solo le reazioni esoergoniche, e quindi irreversibili, della glicolisi, che sono quelle che coinvolgono le molecole di glucosio-6-fosfato, fruttosio-1,6-bifosfato e piruvato. La concentrazione di G6P evolve in tempo secondo l'equazione

$$\frac{dG6P}{dt} = \delta_G GLUT(G_{e \rightarrow i}) - \delta_{G6P} \frac{G6P}{K_{G6P} + G6P} \quad (3.4)$$

quindi aumenta a seguito della fosforilazione del glucosio proveniente dall'esterno, che avviene con un rate δ_G , e diminuisce a causa della successiva reazione che trasforma il glucosio in FBP, fruttosio-1,6-bifosfato, con un tasso δ_{G6P} . Questo a sua volta si trasforma in piruvato con un rate δ_{FBP} , seguendo una catena di reazioni che è sintetizzata nel secondo termine dell'equazione

$$\frac{dFBP}{dt} = \delta_{G6P} \frac{G6P}{K_{G6P} + G6P} - \delta_{FBP} \frac{FBP}{K_{FBP} + FBP} \quad (3.5)$$

L'evoluzione temporale della concentrazione di piruvato prodotta dalla glicolisi è descritta dall'equazione

$$\frac{dPyr}{dt} = 2\delta_{FBP} \frac{FBP}{K_{FBP} + FBP} - \delta_L(H_1) \frac{Pyr}{K_L + Pyr} - \delta_P(O_2)Pyr \quad (3.6)$$

in cui il primo termine rappresenta il flusso proveniente dalle ultime reazioni del processo di glicolisi. Il secondo termine, invece, descrive la trasformazione del piruvato in ioni idrogeno, che avviene quando l'ambiente è ipossico, dunque in maniera proporzionale all'espressione del fattore HIF1. Infatti, il rate con cui si verifica la trasformazione non è costante, ma è dato da una funzione $\delta_L(H_1)$, che dipende in maniera crescente dalla concentrazione di H_1 . In questo caso, si è optato per una funzione di tipo Michaelis-Menten, data dalla seguente espressione

$$\delta_L(H_1) = \tilde{\delta}_L \frac{H_1}{K + H_1} \quad (3.7)$$

Anche l'ultimo addendo dell'equazione (3.6) è un termine di degradazione del piruvato, che rappresenta il flusso di piruvato verso i mitocondri, dove ha luogo la fosforilazione

ossidativa. Questo non è costante, ma è regolato dalla disponibilità di ossigeno nella cellula, dal momento che esso costituisce un reagente fondamentale nel processo ossidativo. Pertanto, anche il rate con cui il piruvato è trasferito nei mitocondri non è costante, ma dipende dalla concentrazione di ossigeno secondo la funzione $\delta_P(O_2)$, crescente nella concentrazione di O_2 .

Infine, si è considerata l'evoluzione temporale della concentrazione interna di ioni idrogeno, rappresentata dalla variabile H_i , dalla quale si può dedurre direttamente il valore del pH interno. Essa segue la dinamica descritta dall'equazione

$$\frac{dH_i}{dt} = \delta_L(H_1) \frac{Pyr}{K_L + Pyr} - \rho(H_i - H_e) \quad (3.8)$$

quindi aumenta a causa del flusso proveniente dal piruvato con tasso $\delta_L(H_1)$ e diminuisce con un tasso ρ . L'ultimo termine dell'equazione (3.8) schematizza sia l'azione dei sistemi tampone della cellula sia il trasporto verso l'esterno mediato dal fattore MCT4, che impediscono un'eccessiva acidificazione dell'ambiente intracellulare. Il valore di H_e nell'equazione (3.8) è costante e rappresenta la concentrazione di ioni idrogeno nell'ambiente esterno, la quale influenza il trasporto attraverso la membrana plasmatica.

Quindi, riassumendo, il metabolismo cellulare è descritto matematicamente dal seguente sistema di 8 equazioni differenziali alle derivate ordinarie definito per $t > 0$

$$\begin{cases} \frac{dH_1}{dt} = \gamma_1 - \delta_1 H_1 - \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) F_{12}(H_1) P_2 \\ \frac{dP_2}{dt} = \gamma_{21} \Gamma_2(H_1) - \delta_{P_2} P_2 \\ \frac{dGLUT}{dt} = \gamma_{GLUT} H_1 - \delta_{GLUT} GLUT \\ \frac{dG_e}{dt} = \delta_G GLUT (-G_{e \rightarrow i}) + \Gamma \\ \frac{dG6P}{dt} = \delta_G GLUT (G_{e \rightarrow i}) - \delta_{G6P} \frac{G6P}{K_{G6P} + G6P} \\ \frac{dFBP}{dt} = \delta_{G6P} \frac{G6P}{K_{G6P} + G6P} - \delta_{FBP} \frac{FBP}{K_{FBP} + FBP} \\ \frac{dPyr}{dt} = 2\delta_{FBP} \frac{FBP}{K_{FBP} + FBP} - \delta_L(H_1) \frac{Pyr}{K_L + Pyr} - \delta_P(O_2) Pyr \\ \frac{dH_i}{dt} = \delta_L(H_1) \frac{Pyr}{K_L + Pyr} - \rho(H_i - H_e) \end{cases} \quad (3.9)$$

dove $G_{e \rightarrow i}$ è il flusso entrante di glucosio riportato nella (3.3) e la funzione $\delta_L(H_1)$ quella della relazione (3.7), con relative condizioni iniziali

$$\begin{cases} H_1(0) = H_{1_0}, & P_2(0) = P_{2_0} \\ GLUT(0) = GLUT_0, & G_e(0) = G_{e_0} \\ G6P(0) = G6P_0, & FBP(0) = FBP_0 \\ Pyr(0) = Pyr_0, & H_i(0) = H_{i_0} \end{cases} \quad (3.10)$$

Volendo analizzare e discutere le condizioni di equilibrio, nella sezione 2.3, sono state già calcolate le concentrazioni di HIF1 e PHD2 allo stato stazionario, che sono date dalla (2.9), invece per le nuove equazioni si ricavano le concentrazioni all'equilibrio imponendo che i secondi membri delle equazioni si annullino. Per la prima equazione si ha

$$\gamma_{GLUT}H_1 - \delta_{GLUT}GLUT = 0 \iff GLUT^{eq} = \frac{\gamma_{GLUT}}{\delta_{GLUT}}H_1^{eq} \quad (3.11)$$

quindi, all'equilibrio, in corrispondenza del picco di concentrazione di HIF1 si verifica anche un picco di concentrazione di GLUT. L'equazione del glucosio esterno invece diventa

$$-\delta_G GLUT \frac{G_e}{K_G + G_e} + \Gamma = 0 \iff G_e^{eq} = \frac{\Gamma K_G}{\delta_G GLUT^{eq} - \Gamma} \quad (3.12)$$

che in funzione di H_1^{eq} si può esprimere come

$$G_e^{eq} = \frac{\Gamma K_G \delta_{GLUT}}{\delta_G \gamma_{GLUT} H_1^{eq} - \delta_{GLUT} \Gamma} \quad (3.13)$$

Quindi, in corrispondenza del massimo di HIF, il glucosio esterno diminuisce a favore di quello interno. Allo stesso modo si può ricavare la concentrazione di glucosio-6-fosfato all'equilibrio come segue

$$\begin{aligned} \delta_G GLUT(G_{e \rightarrow i}) - \delta_{G6P} \frac{G6P}{K_{G6P} + G6P} &= 0 \\ G6P^{eq} &= \frac{\delta_G K_{G6P} GLUT^{eq} G_e^{eq}}{\delta_{G6P}(K_G + G_e^{eq}) - \delta_G GLUT^{eq} G_e^{eq}} \end{aligned} \quad (3.14)$$

che in termini di HIF1 all'equilibrio è dato da

$$G6P^{eq} = \frac{K_{G6P} G_e^{eq} (\delta_G \gamma_{GLUT} H_1^{eq} - \delta_{GLUT} \Gamma)}{\delta_{GLUT} \delta_{G6P} K_G - G_e^{eq}} \quad (3.15)$$

Invece, per la concentrazione di fruttosio-1,6-bifosfato e piruvato all'equilibrio si ottiene

$$\begin{aligned} \delta_{G6P} \frac{G6P}{K_{G6P} + G6P} - \delta_{FBP} \frac{FBP}{K_{FBP} + FBP} &= 0 \\ FBP^{eq} &= \frac{\delta_{G6P} K_{FBP} G6P^{eq}}{\delta_{FBP}(K_{G6P} + G6P^{eq}) - \delta_{G6P} G6P^{eq}} \end{aligned} \quad (3.16)$$

e

$$\begin{aligned} 2\delta_{FBP} \frac{FBP}{K_{FBP} + FBP} - \delta_L(H_1) \frac{Pyr}{K_L + Pyr} - \delta_P(O_2)Pyr &= 0 \\ \delta_P(O_2)(K_{FBP} + FBP)Pyr^2 + \left[(\delta_L(H_1) + \delta_P(O_2)K_L)(K_{FBP} + FBP) \right. \\ \left. - 2\delta_{FBP}FBP \right] Pyr - 2\delta_{FBP}FBPK_L &= 0 \end{aligned} \quad (3.17)$$

Se si tiene conto del fatto che le concentrazioni fisicamente ammissibili sono solo quelle con segno positivo e si identificano le seguenti costanti

$$\begin{aligned} a &= \delta_P(O_2)(K_{FBP} + FBP^{eq}) \\ b &= (\delta_L(H_1^{eq}) + \delta_P(O_2^{eq})K_L)(K_{FBP} + FBP^{eq}) - 2\delta_{FBP}FBP^{eq} \\ c &= -2\delta_{FBP}K_LFBP^{eq} \end{aligned} \quad (3.18)$$

allora l'unica soluzione dell'equazione (3.17) è data da

$$Pyr^{eq} = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (3.19)$$

Infine, la concentrazione di ioni idrogeno interni all'equilibrio, è data da

$$\delta_L(H_1) \frac{Pyr}{K_L + Pyr} - \rho(H_i - H_e) = 0 \quad (3.20)$$

ossia

$$H_i^{eq} = H_e + \frac{\delta_L(H_1^{eq})Pyr^{eq}}{\rho(K_L + Pyr^{eq})} \quad (3.21)$$

Dunque, la concentrazione intracellulare di ioni idrogeno allo stato stazionario dipende anche da quella dell'ambiente esterno.

Dai risultati del sistema di equazioni (3.9) si può dedurre direttamente il valore del pH intracellulare sia stazionario sia tempo dipendente attraverso la relazione

$$pH_i = -\log_{10}(H_i) \quad (3.22)$$

3.4 Simulazioni e risultati numerici

Per ottenere i risultati è stata effettuata una simulazione numerica nel dominio dell'esperimento 1 per il sistema di ODE (3.9) relative al metabolismo cellulare, accoppiato con l'equazione di diffusione dell'ossigeno (1.2). I parametri delle equazioni appena citate sono stati per la maggior parte reperiti in letteratura, da precedenti modelli ed esperimenti in vitro, e sono riassunti nella Tabella 3.1.

Per quanto riguarda i valori iniziali, in [37] si fa riferimento ad una concentrazione di glucosio esterno G_{e_0} di 90 mg/dl, che coincide con $90 \cdot 0.0556$ mol/m³ di glucosio, cioè 5 mM. Questo dato è coerente anche con quanto riportato da Wang in [12], in cui si osservano valori di glucosio esterno in un range tra 0 e 8 mM. Per quella di glucosio interno $G6P_0$, invece, si è imposto un valore pari a un decimo della concentrazione di glucosio esterno, coerentemente con quanto riportato in [37]. Il valore iniziale della concentrazione di ioni idrogeno è stato assunto pari a $H_{i_0} = 10^{-7.4}$, cioè la concentrazione tale che il pH intracellulare iniziale sia quello fisiologico. Inoltre, la costante H_e nell'equazione (3.8) coincide con il pH dell'ambiente esterno, che è stato posto pari a 7.4, come nel setting sperimentale in [5]. Per i parametri presenti nell'equazione del trasportatore GLUT, è stato selezionato un valore del rate di degradazione δ_{GLUT} sulla base del tempo medio di espressione di GLUT, che per quanto riportato in [38], è di circa 4 ore. Combinando questo dato con

la costante di affinità di GLUT, che secondo varie fonti, [38], [41], si attesta attorno al valore di 9.3 mM, si è dedotto il parametro di produzione γ_{GLUT} . Il rate di assorbimento del glucosio esterno δ_G è stato ricavato sulla base della durata temporale del trasporto del glucosio all'interno della cellula, che nel modello matematico di Pan [39] è di 23 ± 8 ms, da cui si deduce un tasso medio pari a $1/23 \text{ ms}^{-1}$. Inoltre, anche la costante K_G del flusso di glucosio è reperibile in letteratura e secondo diverse fonti, [12], [40], è compresa tra i valori 1.5 e 9 mM. Per semplificare il modello, si è considerata una degradazione del piruvato δ_P costante e non dipendente dalla concentrazione di ossigeno, il cui valore è riportato nella Tabella 3.1. I parametri che non sono stati rintracciati in nessun modello matematico presente in letteratura sono stati stimati sulla base dei risultati degli esperimenti in vitro effettuati da Marín-Hernández in [41] su cellule tumorali HeLa in ipossia, le stesse utilizzate anche da Honda [5].

| Parametro | Valore | Fonte | Parametro | Valore | Fonte |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------|----------------|----------------------------------|----------------|
| γ_1 | 0.8 $\mu\text{M/s}$ | – | Γ | 7 mM/s | - |
| δ_1 | 10^{-3} s^{-1} | – | δ_{G6P} | 9 mM/s | - |
| δ_{12}^{ox} | 10^{-2} s^{-1} | [21] | K_{G6P} | 0.4 mM | [41] |
| γ_{21} | $4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ | [21] | δ_{FBP} | 8 mM/s | - |
| δ_{P_2} | 10^{-5} s^{-1} | [21] | K_{FBP} | 0.05 mM | [41] |
| K_{12}^{ox} | 100 μM | [21] | K_L | 2 mM | - |
| K_{12} | 14 μM | [21] | δ_L | $5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ | - |
| γ_{GLUT} | $6.45 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ | [41], [38] | \bar{K} | 0.4 mM | - |
| δ_{GLUT} | $6.94 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ | [38] | δ_P | 2 s^{-1} | - |
| G_{e_0} | 5 mM | [35], [37],[41] | ρ | 500 s^{-1} | - |
| $G6P_0$ | 0.5 mM | [37] | H_{i_0} | $10^{-7.4} \text{ mM}$ | [23], [2], [5] |
| δ_G | 32.26 s^{-1} | [39] | H_e | $10^{-7.4} \text{ mM}$ | [5] |
| K_G | 6.5 mM | [12] | | | |

Tabella 3.1: Parametri relativi al sistema di equazioni (3.9) che descrivono gli effetti dell'ipossia sul metabolismo e sul pH intracellulare.

Il sistema di equazioni (3.9) raggiunge lo stato stazionario dopo circa 2 ore e i profili ottenuti per le variabili del modello coincidono con quelli calcolati analiticamente nella sezione 3.3. I risultati numerici ottenuti in termini di espressione del fattore HIF1 si discostano da quelli ricavati nel capitolo 2, ma rimangono coerenti qualitativamente con le osservazioni effettuate da Honda in [5]. Infatti, come sottolinea lo stesso autore, la distribuzione ad anello di fattore HIF1 nel vetrino è riconducibile all'azione combinata

dell'ossigeno e del pH. In questo caso si sta considerando solo l'effetto dell'ipossia sul fattore HIF1, quindi, come risulta dagli esperimenti in vitro in [5] in condizioni di anossia, il fattore HIF1 tende ad accumularsi quando l'ossigeno è minore. Infatti, dalla simulazione si ricava un profilo di concentrazione di HIF1 all'equilibrio decrescente verso il bordo, con valore massimo dove l'ossigeno è praticamente assente, come si vede nelle Figure 3.4 e 3.5a. Inoltre, coerentemente con la dinamica del sistema HIF1-PHD2, anche la concentrazione stazionaria di PHD2 risulta massima al centro del vetrino e decrescente verso il bordo, come mostrato nella Figura 3.5b.

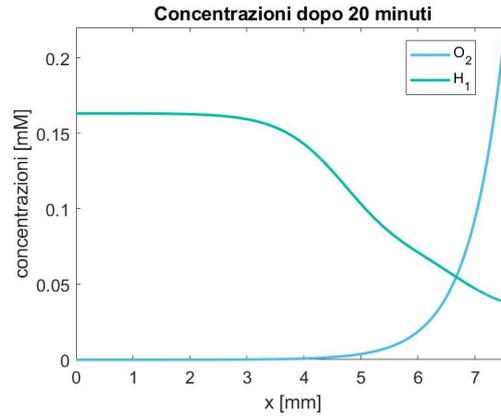


Figura 3.4: Concentrazione di ossigeno e HIF1 dopo 20 minuti, tempo in cui la concentrazione di O_2 raggiunge lo stato stazionario.

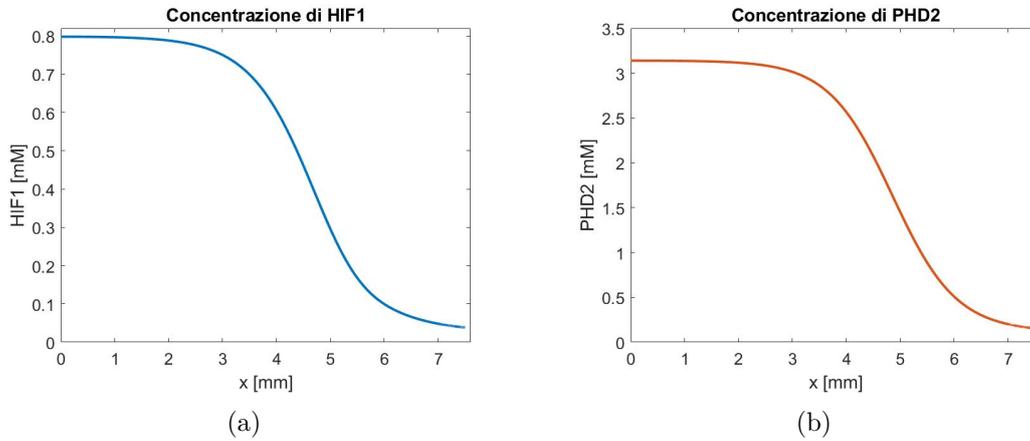


Figura 3.5: Concentrazioni delle variabili di stato del sistema (3.9) all'equilibrio.

Per quanto riguarda i componenti del processo metabolico, si può osservare che all'equilibrio il trasportatore del glucosio GLUT segue lo stesso andamento di HIF1, quindi risulta maggiore al centro e minore al bordo del vetrino, come si vede nella Figura 3.6a. Al contrario, invece, la concentrazione di glucosio extracellulare è minore nelle zone di

sovraespressione di HIF1, dove la richiesta di glucosio è maggiore, in accordo con le osservazioni riportate in [12]. Si registra, quindi, una concentrazione stazionaria di glucosio esterno molto bassa al centro e crescente verso il bordo del dominio, dove HIF1 è quasi nullo, e la variabile G_e raggiunge un valore di 10 mM, come mostrato nella Figura 3.6b. Inoltre, la concentrazione di G6P all'equilibrio è costante e pari a 1.4 mM, in accordo con i valori ottenuti sia in vitro sia dal modello matematico in [41], come secondo la Figura 3.6b.

Anche il fruttosio-1,6-bifosfato e il piruvato allo stato stazionario assumono valori pressoché costanti in tutto il dominio, rispettivamente pari a 0.35 mM e a 7 mM, come riportano le Figure 3.6c e 3.6d. Entrambi i valori rientrano nei rispettivi range ottenuti dal modello matematico e dalle prove in vitro in [41].

Infine il profilo stazionario di concentrazione di ioni H^+ interni alla cellula è riportato nella Figura 3.6e ed è decrescente verso il bordo esterno del vetrino. A partire da questo, si ricava l'andamento del pH intracellulare, il quale è mostrato nella Figura 3.6f e, come atteso, risulta crescente verso il bordo. Dunque, le zone in ipossia sono caratterizzate da una maggiore concentrazione di H_i e risultano più acide, mentre il bordo a contatto con l'ambiente esterno presenta un pH neutro.

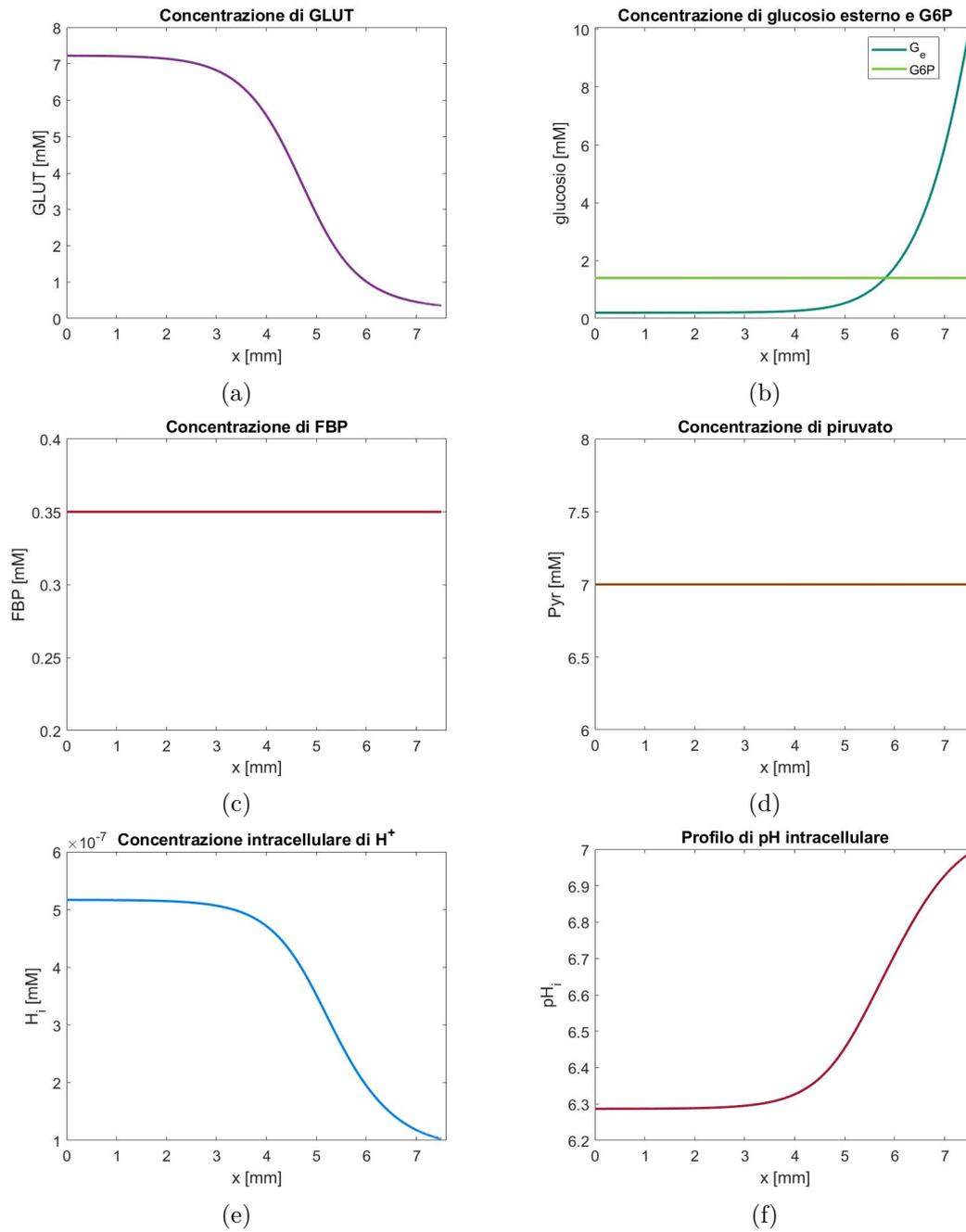


Figura 3.6: Concentrazioni delle variabili di stato del sistema (3.9) all'equilibrio.

Al variare dell'acidità dell'ambiente esterno, cambia anche il profilo di pH risultante dal modello matematico. Infatti, se si ripete la simulazione assumendo che il pH dell'ambiente esterno sia più acido di quello fisiologico, si osserva una riduzione del pH intracellulare, mentre un pH esterno più basico comporta una minore acidificazione delle cellule. Questo

è in linea con quanto riportato da Honda [5], dove si sottolinea che il pH del liquido di coltura influenza il pH intracellulare. Il confronto tra i profili di pH ottenuti a partire da 3 diversi valori di H_e e quindi di pH esterno sono riportati nella Figura 3.7.

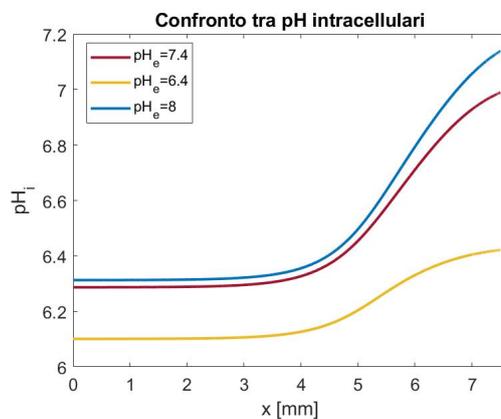


Figura 3.7: Andamento del pH intracellulare al variare del pH dell'ambiente esterno al vetrino.

Conclusioni e possibili sviluppi futuri

A valle dell'analisi effettuata, si può osservare che i risultati del modello matematico rispecchiano il comportamento dei fattori coinvolti e riproducono in maniera soddisfacente i meccanismi biologici simulati. Il modello matematico di diffusione e assorbimento, descritto nel capitolo 1, riproduce in maniera soddisfacente il comportamento dell'ossigeno nei due setting sperimentali considerati. Infatti, come suggerito dalla fisica del problema, si ottiene una concentrazione di O_2 massima in prossimità della sorgente di ossigeno e minima nei punti più lontani da essa, coerentemente con i dati in vitro rilevati in [5] e [10]. A partire dal calcolo della distribuzione di ossigeno, si riescono ad individuare le zone del dominio in ipossia, più o meno severa, e a studiarne gli effetti sul fattore inducibile HIF tramite un opportuno sistema di equazioni. In questo senso, il modello matematico illustrato nel capitolo 2 schematizza l'influenza dell'ipossia e del pH sull'espressione del fattore HIF. La modellazione matematica restituisce un profilo di concentrazione di fattore HIF con un picco in prossimità del bordo a contatto con l'ambiente esterno, analogo a quello rilevato da Honda in [5]. Inoltre, attraverso il precedente modello matematico, si riesce anche a riprodurre il comportamento qualitativo in vitro del massimo di HIF al variare della concentrazione esterna di ossigeno. Infine, nel capitolo 3 è stato sviluppato un modello matematico del metabolismo anaerobico delle cellule per studiare gli effetti dell'ipossia, quindi del fattore HIF, sul processo metabolico e di conseguenza sulla distribuzione di pH. Dai risultati numerici emerge un accumulo di ioni idrogeno intracellulari nelle regioni dove la concentrazione di ossigeno è minima, con successiva acidificazione della zona. All'equilibrio, dunque, a seguito del processo metabolico cellulare si giunge a un profilo di pH crescente verso il bordo esterno del dominio, simile a quello misurato in vitro in [5].

Il modello sviluppato nel presente lavoro può essere ampliato per riprodurre il fenomeno biologico in maniera più accurata. Ad esempio, nel sistema (2.1) della dinamica di HIF1-PHD2, si potrebbero includere anche le equazioni per il fattore HIF2, l'enzima PHD3 e altri fattori che regolano l'espressione di HIF, come, invece, viene effettuato negli studi [21] e [34]. In aggiunta, si potrebbe ampliare il sistema metabolico, considerando ulteriori equazioni per i prodotti intermedi della glicolisi oppure inserendo una modellazione esplicita per il trasporto di ioni idrogeno attraverso la membrana plasmatica. A tal fine, si potrebbero includere i flussi di trasporto mediati dai fattori MCT1 e MCT4, oppure i diversi sistemi tampone cellulari e i trasportatori coinvolti nella regolazione del pH, come

quello riportato in [30]. Inoltre, qualora fosse possibile, sarebbe interessante testare il modello in altri setting sperimentali e confrontarne i risultati con quelli ottenuti in vitro. In aggiunta, poiché dalle simulazioni non emerge la concentrazione di HIF ad anello rilevata sperimentalmente da Honda [5], andrebbe approfondita sperimentalmente la relazione tra espressione di HIF e pH, con particolare attenzione al ruolo della proteina HSP90. Infatti, come mostrato nel capitolo 2, considerando il legame tra HIF e pH si riescono ad ottenere risultati qualitativamente simili a quelli di Honda, mentre la sola valutazione del metabolismo anaerobico, semplificato dal modello mostrato nel capitolo 3, non riesce a giustificare la comparsa dell'anello di espressione di HIF, ma solo l'instaurarsi del gradiente di pH. Infine, considerando che l'ipossia ricopre un ruolo rilevante nell'ambito della cancerogenesi anche nella transizione epitelio-mesenchimale, con cui le cellule perdono le loro caratteristiche fenotipiche e acquisiscono maggiori capacità migratorie e invasive. A questo proposito, si potrebbe integrare nel modello il network dei fattori coinvolti nella transizione, che è direttamente influenzato da HIF, come nello studio di Wang et al. in [42].

Bibliografia

- [1] P. Lee, N. S. Chandel, M. C. Simon, *Cellular adaptation to hypoxia through HIFs and beyond*, Nat Rev Mol Cell Biol. 2020 May ; 21(5): 268–283. doi:10.1038/s41580-020-0227-y
- [2] J. Chiche, M. C. Brrahimi-Horn, J. Pouyssegur, *Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer*, J. Cell. Mol. Med. Vol 14, No 4, 2010 pp. 771-794
- [3] G. L. Semenza, *Mechanisms of Breast Cancer Stem Cell Specification and Self-Renewal Mediated by Hypoxia-Inducible Factor 1*, Stem Cells Translational Medicine, 2023, XX, 1–8 <https://doi.org/10.1093/stcltm/szad061>
- [4] Filatova A., Seide S., et al, *Acidosis Acts through HSP90 in a PHD/ VHL-Independent Manner to Promote HIF Function and Stem Cell Maintenance in Glioma*, American Association for Cancer Research Journal (2016)
- [5] Honda T., Hirakawa Y., Mizukami K., Yoshihara T., Tanaka T., Tobita S., Nangaku M., *A distinctive distribution of hypoxia-inducible factor-1 α in cultured renal tubular cells with hypoperfusion simulated by coverslip placement*, Physiological reports (2020), DOI: 10.14814/phy2.14689
- [6] S. Fakhri et al, *Modulation of hypoxia-inducible factor-1 signaling pathways in cancer angiogenesis, invasion, and metastasis by natural compounds: a comprehensive and critical review*, Cancer and Metastasis Reviews <https://doi.org/10.1007/s10555-023-10136-9> (2023)
- [7] U. Cheema, Z. Rong et al., *Oxygen diffusion through collagen scaffolds at defined densities: implications for cell survival in tissue models*, J Tissue Eng Regen Med 2012;6: 77–84.
- [8] N. R. MacIntyre MD FAARC, *Tissue Hypoxia: Implications for the Respiratory Clinician*, RESPIRATORY CARE • OCTOBER 2014 VOL 59 NO
- [9] A. Colom, R. Galgoczy et al., *Oxygen diffusion and consumption in extracellular matrix gels: Implications for designing three-dimensional cultures*, (2014) J Biomed Mater Res Part A 2014:102A:2776–2784

-
- [10] M. Arocena, M. Landeira et al., *Using a variant of coverslip hypoxia to visualize tumor cell alterations at increasing distances from an oxygen source*, J Cell Physiol. 2019;234:16671–16678
- [11] E. Milotti, S. Stella, R. Chignola, *Pulsation-limited oxygen diffusion in the tumour microenvironment*, Scientific Reports (2017) 7:39762, DOI: 10.1038/srep39762
- [12] Wang Q. et al, *Exploring the quantitative relationship between metabolism and enzymatic phenotype by physiological modeling of glucose metabolism and lactate oxidation in solid tumors*, Phys. Med. Biol. 60 2547 (2015)
- [13] G. L. Semenza, *Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level*, PHYSIOLOGY 19: 176–182, 2004; 10.1152/physiol.00001.2004
- [14] E. R. Watts, S. R. Walmsley, *Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity*, Trends in Molecular Medicine, January 2019, Vol. 25, No. 1
- [15] Y. V. Liu, J. H. Baek et al., *RACK1 Competes with HSP90 for Binding to HIF-1 α and is Required for O₂-independent and HSP90 Inhibitor-induced Degradation of HIF-1 α* , Mol Cell. 2007 January 26; 25(2): 207–217. doi:10.1016/j.molcel.2007.01.001
- [16] E. Minet et al., *Hypoxia-induced activation of HIF-1 : role of HIF-1K-Hsp90 interaction*, FEBS Letters 460 (1999) 251-256
- [17] J. Bagnall et al., *Tight Control of Hypoxia-inducible Factor- α Transient Dynamics Is Essential for Cell Survival in Hypoxia*
- [18] J. Leedale et al., *Modeling the dynamics of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 α) within single cells and 3D cell culture systems*, Mathematical Biosciences 258 (2014) 33–43
- [19] G. Bocharov, W. Jager, J. Knoch, M. Neuss-Radu, M. Thiel, *A Mathematical Model of HIF-1 Regulated Cellular Energy Metabolism*, Vietnam Journal of Mathematics (2021) 49:119–141
- [20] L. K. Nguyen, M. A. S. Cavadas, *A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) network*
- [21] P. Ferrante, L. Preziosi, M. Scianna, *Modeling hypoxia-related inflammation scenarios*, Mathematical Biosciences 355 (2023)
- [22] A. Hulikova et al., *Regulation of Intracellular pH in Cancer Cell Lines Under Normoxia and Hypoxia*, J. Cell. Physiol. 228: 743–752, 2013.
- [23] J. Michl et al., *Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems*, COMMUNICATIONS BIOLOGY (2019) 2:144
- [24] R. H. Garret, C. R. Grisham, *Biochimica*, Piccin Nuova Libreria (2014)

- [25] M. Ullah, A. J. Davies, A. Halestrap, *The Plasma Membrane Lactate Transporter MCT4, but Not MCT1, Is Up-regulated by Hypoxia through a HIF-1 α -dependent Mechanism*, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 281, NO. 14, pp. 9030–9037, April 7, 2006
- [26] N. S. Chandel, *Glycolisys*, Cold Spring Harb Perspect Biol 2021;13:a040535
- [27] H. De Vitto et al., *Part III. Molecular changes induced by high nitric oxide adaptation in human breast cancer cell line BT-20 (BT-20-HNO): a switch from aerobic to anaerobic metabolism*, Tumor Biol. (2013) 34:403–413 DOI 10.1007/s13277-012-0564-3
- [28] R. Chignola, E. Milotti, *A phenomenological approach to the simulation of metabolism and proliferation dynamics of large tumour cell populations*, Phys. Biol. 2 8 (2005)
- [29] R. Chignola et al., *Ab initio phenomenological simulation of the growth of large tumor cell populations*, Phys. Biol. 4 114 (2007)
- [30] Piasentin, Chignola, Milotti, *The control of acidity in tumor cells: a biophysical model*, Scientific Reports (2020) 10:13613
- [31] C. Phipps, H. Molavian, M. Kohandel, *A microscale mathematical model for metabolic symbiosis: Investigating the effects of metabolic inhibition on ATP turnover in tumors*, Journal of Theoretical Biology 366 (2015) 103-114
- [32] J. B. McGillen, C. J. Kelly et al., *Glucose–lactate metabolic cooperation in cancer: Insights from a spatial mathematical model and implications for targeted therapy*, Journal of Theoretical Biology 361 (2014) 190-203
- [33] M. Robertson-Tessi, R. J. Gillies, R. A. Gatenby, A. R.A. Anderson, *Impact of Metabolic Heterogeneity on Tumor Growth, Invasion, and Treatment Outcomes*, American Association for Cancer Research (2015) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1428
- [34] K. Spinicci, P. Jacquet, G. Powathil, A. Stéphanou, *Modeling the role of HIF in the regulation of metabolic key genes LDH and PDH: Emergence of Warburg phenotype*, Computational and Systems Oncology published by Wiley Periodicals LLC (2022) DOI: 10.1002/cso2.1040
- [35] P. Jacquet, A. Stéphanou, *A reduced model of cell metabolism to revisit the glycolysis-OXPHOS relationship in the deregulated tumor microenvironment*, Journal of Theoretical Biology 562 (2023) 111434
- [36] Stokka S. H., S. H. Eivind, Fjeld G., *A Model of Aerobic and Anaerobic Metabolism in Cancer Cells – Parameter Estimation, Simulation, and Comparison with Experimental Results*, SIMS EUROSIM 2021, DOI: 10.3384/ecp21185465
- [37] M. Hall, J. Hall, *Guyton e Hall: Fisiologia medica*, 2021, Edra
- [38] B. S. Sorensen et al., *Influence of oxygen concentration and pH on expression of hypoxia induced genes*, Radiotherapy and Oncology 76 (2005) 187–193

- [39] Y. Pan et al., *Single glucose molecule transport process revealed by force tracing and molecular dynamics simulations*, The Royal Society of Chemistry (2018)
- [40] J. Duarte, *Steady-state brain glucose transport kinetics re-evaluated with a four-state conformational model*, *Frontiers in Neuroenergetics* Volume 1 (2009)
- [41] A. Marín-Hernández et al, *Modeling cancer glycolysis*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1807 (2011) 755–767
- [42] H. Wang, X. Zhang, W. Wang, *Regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in hypoxia by the HIF-1 α network*, *FEBS Letters* 596(2022) 338–349^a2021 Federation of European Biochemical Societies