



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Matematica

Anno Accademico 2025/2026

Sessione di laurea luglio 2026

Modello di reazione-diffusione per la formazione di cluster tumorali mediata dall'acidificazione del microambiente

Relatrice:

Prof.ssa Chiara Giverso

Candidato:

Marco Munarin – s332128

Sommario

La crescita di una massa tumorale è un processo complesso che coinvolge il nostro corpo, inteso come sistema interconnesso, nella sua interezza. Le neoplasie sono insiemi di cellule che hanno subito delle alterazioni epigenetiche e che si adattano continuamente per poter sopravvivere nel luogo in cui si sono ritrovate a crescere. Come effetto di questa continua evoluzione, le cellule neoplastiche hanno riprogrammato il loro metabolismo, noto come effetto Warburg, conferendo loro un vantaggio competitivo selettivo alla sopravvivenza nel microambiente. Questa tesi studia, mediante modelli di reazione-diffusione, come l'interazione tra metabolismo cellulare e acidità del microambiente possa portare all'insorgenza e all'organizzazione spaziale di *cluster* di cellule tumorali, mediata dal processo di acidificazione del microambiente. Secondo l'ipotesi dell'invasione mediata dall'acidità, è proprio questo *feedback* negativo mediato dall'ambiente a guidare l'invasione tissutale.

Il primo modello proposto, ispirato per analogia funzionale ai sistemi di formazione di *pattern* di vegetazione in ecologia, è un sistema di tre equazioni di reazione-diffusione che descrive la densità di cellule tumorali, la concentrazione di nutrienti e quella di ioni H^+ . Il secondo modello estende il primo affiancando alla popolazione neoplastica una popolazione di cellule sane in competizione per lo spazio e per i nutrienti, risultando in un sistema di quattro equazioni che incorpora un tasso di transizione fenotipica e un termine di morte per contatto fra le due specie. Dopo averne ricavato le formulazioni adimensionali, si è condotta su entrambi i sistemi l'analisi di stabilità lineare: individuati gli equilibri omogenei e applicati i criteri di Routh-Hurwitz alla matrice delle perturbazioni spaziali, si sono identificate per via numerica le condizioni di insorgenza dell'instabilità di Turing. Per il modello a singola popolazione si è individuata una soglia critica $\beta_c \simeq 0.405$ nel parametro di sensibilità all'acidosi; per il modello a due popolazioni, l'instabilità di Turing emerge per una sensibilità all'acidosi $\beta_t \gtrsim 0.17$ e per un intervallo intermedio di valori della proliferazione tumorale.

I modelli sono stati implementati e risolti numericamente in ambiente COMSOL Multiphysics® su un dominio bidimensionale. Le simulazioni confermano il meccanismo previsto dall'analisi lineare e mostrano che i due parametri biologici svolgono ruoli distinti. In particolare, la sensibilità all'acidosi agisce come parametro

di controllo della biforcazione, selezionando la morfologia asintotica del *pattern* con una transizione continua da filamenti labirintici a macchie isolate, mentre la proliferazione cellulare ne governa la velocità di evoluzione. La lunghezza d'onda caratteristica osservata risulta in accordo quantitativo con quella predetta dall'analisi lineare; inoltre, le simulazioni a partire da una neoplasia localizzata riproducono la comparsa di una zona centrale compatibile con la necrosi e l'ipossia, coerente con la fenomenologia dei carcinomi solidi avascolari. Le simulazioni del modello competitivo a due popolazioni confermano la robustezza del meccanismo di Turing rispetto all'introduzione della seconda popolazione cellulare, evidenziando un marcato rallentamento della dinamica indotto dalla competizione per le risorse con il tessuto sano, nonché l'esistenza di un regime di saturazione omogenea privo di *pattern* quando la sensibilità all'acidosi è insufficiente. Un confronto qualitativo fra i risultati dei modelli e le immagini istologiche di mesoteliomi pleurico e peritoneale diffusi evidenzia una corrispondenza morfologica tra la struttura a *cluster* discreti delle neoplasie reali e i *pattern* di Turing prodotti dalle simulazioni, a sostegno della plausibilità biologica del meccanismo proposto.

L'elaborato è organizzato come segue. Il primo capitolo introduce il contesto biologico e lo stato dell'arte della modellazione matematica del metabolismo tumorale. Il secondo capitolo presenta la formulazione dei modelli, le rispettive adimensionalizzazioni e le analisi di stabilità lineare. Il terzo capitolo discute l'implementazione numerica, i risultati delle simulazioni e il confronto qualitativo con immagini istologiche. Il quarto capitolo riassume i risultati, ne interpreta il significato biologico, ne discute i limiti e delinea i possibili sviluppi futuri.

Parole chiave: modelli di reazione-diffusione; instabilità di Turing; effetto Warburg; microambiente tumorale; invasione mediata dall'acidità; analisi di stabilità lineare.

Keywords: reaction-diffusion models; Turing instability; Warburg effect; tumour microenvironment; acid-mediated invasion; linear stability analysis.

Indice

1	Introduzione alla Biologia Tumorale	1
1.1	Le Caratteristiche delle Neoplasie	2
1.2	Metabolismo Cellulare Fisiologico	7
1.3	Metabolismo Riprogrammato	10
1.4	Stato dell'arte: Modellazione Matematica	13
2	Il modello matematico	18
2.1	Dai Pattern nella Vegetazione ai Pattern nell'Oncologia	18
2.2	Il Modello di Reazione - Diffusione	19
2.3	Modello Adimensionale a Singola Popolazione	21
2.3.1	Analisi Dimensionale	22
2.3.2	Analisi di Stabilità Lineare	23
2.4	Modello a due popolazioni cellulari: Sane vs Tumorali	29
2.4.1	Sistema Adimensionalizzato	29
2.4.2	Analisi di Stabilità Lineare	31
3	Implementazione Numerica e Risultati	38
3.1	Implementazione in COMSOL Multiphysics®	38
3.2	Scelta dei Parametri	40
3.3	Genesi di Pattern nel Modello a Singola Popolazione	43
3.4	Pattern nel Secondo Modello	57
3.5	Confronto con Immagini Istologiche	65
3.6	Sintesi dei Risultati	70
4	Conclusioni	73
4.1	Sintesi del Lavoro	73
4.2	Discussione e Interpretazione Biologica	75
4.3	Limiti dello Studio	76
4.4	Sviluppi Futuri	77
	Bibliografia	79

Capitolo 1

Introduzione alla Biologia Tumorale

La proliferazione è un tassello fondamentale nella vita di una cellula che si riproduce e moltiplica in modo sano grazie a vari punti di controllo nel suo ciclo cellulare. Il fallimento di tali *checkpoint* può favorire l'accumulo di alterazioni genetiche ed epigenetiche che, se incontrollate, potrebbero portarla a sviluppare un fenotipo maligno. Infatti, il tumore è un processo evolutivo in un microambiente che seleziona cellule con caratteristiche morfologiche e funzionali utili alla crescita e all'evoluzione della massa tumorale. Sebbene la proliferazione incontrollata sia il tratto comune a tutte le neoplasie, esiste una distinzione fondamentale tra le forme benigne e maligne. Il tumore benigno, pur aumentando la massa cellulare, rimane confinato nel tessuto d'origine; al contrario, il tumore maligno evolve acquisendo fenotipi aggressivi e, tra questi, il processo di metastatizzazione rappresenta un evento cruciale. Più precisamente, a seguito di specifiche alterazioni genetiche, le sottopopolazioni cellulari acquisiscono la capacità di distaccarsi dalla massa primaria, invadere i tessuti circostanti e disseminarsi nell'organismo per colonizzare organi distanti [22]. La progressione metastatica, le cui tempistiche variano in base al soggetto e all'istologia del tumore, costituisce lo stadio più avanzato della malattia ed è responsabile di circa il 90% dei decessi oncologici [26]. L'effetto Warburg è il motore metabolico che sostiene crescita, sopravvivenza ed invasione ed è un preciso vantaggio selettivo. La scelta della glicolisi aerobica, come via metabolica principe, mira a soddisfare la rapida proliferazione fornendo energia e precursori biosintetici, generando grandi quantità di lattato come prodotto di scarto. Il risultato è un abbassamento del pH del microambiente tumorale che può conferire al tumore stesso i vantaggi necessari alla proliferazione ed invasione. Quindi, come si esporrà nel dettaglio successivamente, la massa tumorale è capace di crearsi le condizioni per favorirsi nella competizione di risorse e spazio nell'organismo di un

essere vivente.

Nella complessità di questo contesto, la modellazione matematica permette di fare delle previsioni sul comportamento e dinamica di invasione del tumore. I modelli di reazione-diffusione sono tra gli approcci più consolidati e analiticamente trattabili per farlo. In questa tesi, si studia come l'interazione tra le cellule e l'acidificazione del microambiente possa portare all'insorgenza di raggruppamenti cellulari (*clustering*).

1.1 Le Caratteristiche delle Neoplasie

L'omeostasi di un organismo pluricellulare complesso, regolata da intricate reti metaboliche e di segnalazione, dipende da un delicato equilibrio tra proliferazione, differenziamento e morte cellulare, che riflette il corretto funzionamento del ciclo cellulare. Infatti, un malfunzionamento di questo processo, dovuto al fallimento dei punti di controllo, può determinare l'insorgenza di patologie tumorali, correlate all'acquisizione di cellule anomale con caratteristiche aggressive.

Le cellule costituiscono la base di un organismo vivente e sono costituite principalmente da molecole organiche come carboidrati, lipidi, proteine e acidi nucleici. Al loro interno avvengono reazioni biochimiche e metaboliche catalizzate dagli enzimi, proteine capaci di accelerare tali processi. Queste reazioni avvengono all'interno di organelli subcellulari delimitati da membrane, tra cui il nucleo (contenente il patrimonio genetico), i mitocondri (responsabili della produzione di energia), il reticolo endoplasmatico (sede dell'assemblaggio degli amminoacidi in proteine e degli acidi grassi in lipidi) e l'apparato di Golgi (che elabora e indirizza le sostanze prodotte). La membrana plasmatica circonda la cellula e le consente lo scambio di acqua, nutrienti, ossigeno e anidride carbonica. Ogni componente della cellula contribuisce a svolgere la sequenza ordinata di eventi che le consentono la crescita, la duplicazione del proprio contenuto genetico e la divisione in due cellule figlie, completando così il suo ciclo fisiologico, suddiviso in interfase e fase mitotica. Nella prima avvengono le funzioni metaboliche, di crescita e di duplicazione del DNA della cellula, con diversi punti di controllo, mentre nella seconda avviene la duplicazione cellulare. Durante la trascrizione del patrimonio genetico contenuto nel DNA, è possibile che si introducano degli errori, in gran parte corretti da sistemi dedicati nei punti di controllo dell'interfase, almeno finché la cellula e l'organismo sono in buona salute. Non è così semplice sfuggirvi per una cellula duplicatasi male, poiché il controllo intracellulare ed extracellulare è molto stringente. Tuttavia, durante la proliferazione cellulare si producono continuamente cellule anormali, alcune delle quali potrebbero diventare maligne a causa di mutazioni genetiche (base della variabilità genetica) dovute, nella maggior parte dei casi, ad errori casuali, verificatesi, come già detto, durante la replicazione del DNA prima della

divisione cellulare o, in aggiunta, a causa di lesioni dovute ad agenti cancerogeni. Dagli anni '80, si riconosce ai cancerogeni ambientali la responsabilità di indurre alterazioni genetiche, causando il cancro, inteso come un insieme di tante patologie che hanno cause diverse e colpiscono tessuti ed organi differenti, ognuna delle quali richiede esami diagnostici e soluzioni terapeutiche *ad hoc*. È stato stimato che esse debbano subire da quattro a sette eventi genetici o epigenetici indipendenti per acquisire un fenotipo maligno [1]. A favore di ciò, la cellula maligna riesce a replicarsi velocemente e in modo incontrollato, accumulando mutazioni. Questa catena di alterazioni genetiche è necessaria allo sviluppo tumorale e necessita di tempo; per questo è solitamente un processo lungo. In rari casi, queste mutazioni sono ereditate dal patrimonio genetico e non va trascurata la predisposizione personale: infatti, gli stessi agenti possono indurre degli effetti diversi in persone diverse [2]. Le condizioni che facilitano l'acquisizione di cellule tumorali sono l'instabilità genomica, la mutazione e l'infiammazione protumorale [15].

Come già detto, la cancerogenesi non ha un andamento definito, ma è strettamente correlata all'individuo e ha inizio da una cellula progenitrice che subisce un'alterazione epigenetica, che diventa incontrollata. A completare meglio il quadro, è noto che la cellula maligna può essere presente fin dalla nascita, ma non è capace di proliferare senza freni fino a che il microambiente in cui si trova è sfavorevole alla sua espansione. Quindi, l'ambiente non solo innesca il processo, ma ne influenza costantemente l'evoluzione. Un microambiente infiammato può favorire il danneggiamento del DNA nelle cellule, ponendo le basi per la nascita e la crescita del tumore. Esso produce sostanze che inibiscono l'azione delle cellule immunitarie e ne alterano il comportamento a vantaggio della malattia, facilitando la sopravvivenza e la crescita delle cellule cancerose, anche stimolando la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi) [32].

È possibile individuare delle caratteristiche biologiche funzionali comuni a tutte le cellule tumorali che originano le varie patologie. Nei lavori di Hanahan del 2000 [4] e del 2011 [15], inizialmente sono state individuate otto caratteristiche fondamentali:

- Autosufficienza nei segnali di crescita: Le cellule tumorali possono produrre i propri fattori di crescita, mantenendo attive le vie di segnalazione per la divisione cellulare cronica.
- Elusione/perdita dei segnali di soppressione della crescita: Perdita dei geni oncosoppressori che normalmente bloccano il ciclo cellulare.
- Resistenza alla morte cellulare: Le cellule maligne sviluppano strategie per evitare la morte programmata (apoptosi) e altre forme di morte.
- Abilitazione dell'immortalità replicativa: Le cellule riescono a superare i limiti di replicazione per generare tumori macroscopici.

- Induzione dell'angiogenesi: I tumori sono capaci di utilizzare il VEGF per attivare la formazione o reclutamento di nuovi vasi sanguigni, garantendosi l'apporto di ossigeno e nutrienti.
- Attivazione dell'invasione e delle metastasi: Questa capacità permette la diffusione del tumore dal sito primario, invadendo tessuti ed organi.
- Elusione della distruzione immunitaria: Le cellule tumorali sviluppano meccanismi per evitare il riconoscimento e l'eliminazione da parte del sistema immunitario.
- Riprogrammazione del metabolismo energetico: Adozione di fenotipi metabolici ibridi, tra cui l'effetto Warburg (glicolisi aerobica) e fosforilazione ossidativa per sostenere la crescita.

E due caratteristiche abilitanti:

- Instabilità genomica e mutazione: Accumulo accelerato di alterazioni genetiche che permettono l'evoluzione clonale e l'acquisizione casuale di vantaggi selettivi.
- Infiammazione pro-tumorale: La risposta immunitaria infiammatoria può favorire il tumore, fornendo molecole bioattive (come i fattori di crescita ed enzimi pro-angiogenici).

Queste ultime sono condizioni che facilitano l'acquisizione delle capacità funzionali e insieme rendono possibile la sopravvivenza, proliferazione e progressione delle cellule tumorali. Successivamente nel 2022 [28], Hanahan propose due nuove capacità funzionali distintive (si veda la figura 1.1), di cui solo la prima verrà confermata nel lavoro del 2026 [32]:

- Plasticità fenotipica: Permette alle cellule di sfuggire allo stato di differenziazione terminale (processo finale di differenziamento della cellula staminale acquisendo caratteristiche funzionali specifiche, cessando di proliferare), cambiando stato per adattarsi e resistere alle terapie.
- Cellule senescenti (*zombie*): Sono cellule che smettono di dividersi nel microambiente tumorale, ma non muoiono favorendo la crescita del tumore.

E due nuove capacità abilitanti:

- Riprogrammazione epigenetica non mutazionale: Coinvolge cambiamenti nell'espressione genica che facilita l'acquisizione di tratti maligni senza alterare la sequenza del DNA.
- Microbiomi polimorfici: La variazione nei microbiomi tra gli individui può influenzare lo sviluppo del tumore, l'infiammazione e la risposta alle terapie.

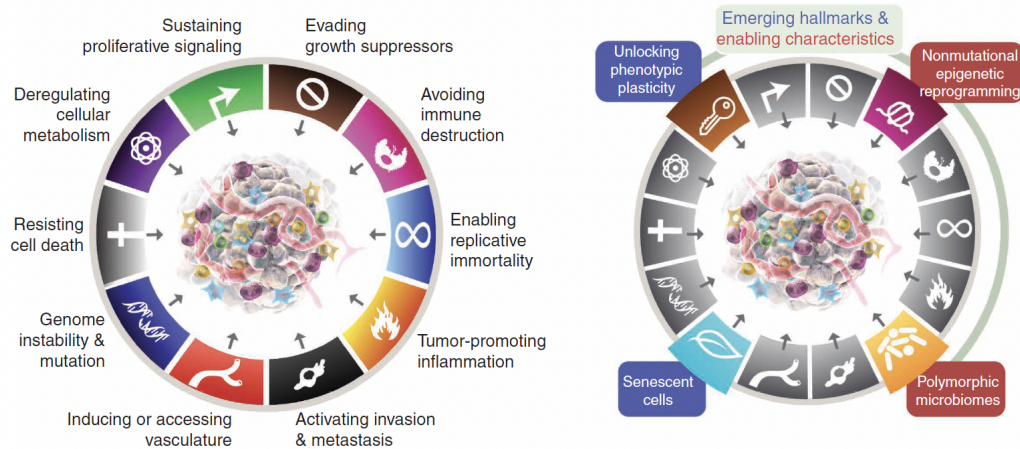


Figura 1.1: In sintesi: gli *Hallmarks of Cancer* aggiornati al 2022 [28]. A sinistra: Gli *Hallmarks of Cancer* comprendono attualmente otto capacità distintive (*hallmark capabilities*) e due caratteristiche abilitanti (*enabling characteristics*). **A destra:** Questa revisione incorpora ulteriori proposte di *hallmarks* emergenti e caratteristiche abilitanti, che coinvolgono lo "sblocco della plasticità fenotipica" (*unlocking phenotypic plasticity*), la "riprogrammazione epigenetica non mutazionale" (*nonmutational epigenetic reprogramming*), i "microbiomi polimorfici" (*polymorphic microbiomes*) e le "cellule senescenti" (*senescent cells*).

Sempre Hanahan nel 2026 [32] riorganizza e riordina l'evoluzione della ricerca oncologica degli ultimi 25 anni, identificando la complessità della malattia attraverso una struttura articolata in quattro dimensioni parametriche: Capacità Funzionali (*Hallmarks*), Caratteristiche Fenotipiche Abilitanti, Cellule del Microambiente Tumorale (TME), Interazioni Sistemiche. La prima dimensione comprende le otto capacità funzionali consolidate nel 2022, confermando lo sblocco della plasticità fenotipica come caratteristica emergente. Nella seconda dimensione, l'acquisizione degli *hallmarks* è facilitata da cinque fattori abilitanti, tra cui l'innervazione, ovvero la capacità dei tumori di sfruttare l'infiltrazione neuronale e il rilascio di neurotrasmettitori nel TME per modulare vari *hallmarks*, come proliferazione, sopravvivenza e metastasi. La terza dimensione riflette l'evoluzione del concetto di microambiente tumorale, riconoscendo i tumori come degli organi anomali, composti da diversi elementi. Un aspetto innovativo è rappresentato dalle cellule senescenti che, pur avendo smesso di dividersi, contribuiscono attivamente alla biologia del tumore tramite la secrezione di fenotipi che stimolano altre cellule del TME. La quarta dimensione considera il cancro come una malattia sistemica, sottolineando le interazioni dei tumori con l'intero organismo attraverso i sistemi circolatorio, linfatico, nervoso, immunitario e fattori fisiologici globali, quali invecchiamento e obesità, che modulano l'acquisizione degli *hallmarks*. Infine, la quinta dimensione

riguarda le prospettive terapeutiche di *Co-Targeting*, una strategia che prevede l'attacco simultaneo di diverse capacità funzionali indipendenti per evitare lo sviluppo della resistenza adattativa e colpire la malattia su più fronti.

Tra le caratteristiche biologiche del cancro, una delle più studiate al mondo è la riprogrammazione del metabolismo cellulare, nota come Effetto Warburg o glicolisi aerobica. Poiché l'obiettivo della cellula cancerosa è crescere rapidamente, essa utilizza la glicolisi per trasformare grandi quantità di glucosio, anche in condizioni ben ossigenate, in adenosina trifosfato (ATP) per sostenersi energeticamente. Questa via metabolica è meno efficiente della fosforilazione ossidativa, ma più rapida. Le grandi quantità di acido lattico, come scarto di questo metabolismo, portano inevitabilmente all'acidificazione del microambiente cellulare, creando un ambiente tossico per le cellule sane che favorisce la metastasi. L'ambiente acido, così indotto, potrebbe indurre altre cellule a comportarsi in modo anomalo, creando eterogeneità metabolica pH-dipendente nel tumore [10, 15, 16, 17, 20, 28].

Nel contesto del lavoro proposto in questa tesi, la plasticità fenotipica e eterogeneità rispecchiano la capacità della cellula tumorale di transitare tra stati fenotipi differenti in risposta a stimoli ambientali, come l'acidificazione del microambiente, favorendo l'emergere di *cluster* con fenotipi resistenti all'acido e maggiormente aggressivi. L'interazione tra le due caratteristiche precedenti porta all'attivazione della fase metastatica. Infatti, il gradiente acido indotto dal lattato nel microambiente tumorale (TME) (si veda la figura 1.3) è tossico per le cellule sane e la matrice extracellulare. Lo spazio libero lasciato dal tessuto sano degradato è così invaso dalle cellule neoplastiche, adattate a questo ambiente ostile (plasticità). Questa ipotesi, nota come "*Acid-mediated invasion hypothesis*" supportata da Gatenby et al. [3], costituisce il fondamento fisico-matematico del modello di reazione-diffusione che verrà analizzato nei capitoli successivi.

L'Effetto Warburg, l'acidificazione del microambiente e l'eterogeneità metabolica sono aspetti ampiamente caratterizzati singolarmente dalla letteratura scientifica. Questo lavoro di tesi si propone di investigare come l'interazione bidimensionale tra il metabolismo cellulare e il pH del microambiente guidi l'insorgenza e organizzazione spaziale di *cluster* tumorali metabolicamente eterogenei. Per fare ciò, si è analizzato in primo luogo un modello semplificato a tre variabili e, successivamente, è stato arricchito includendo la competizione con altre cellule, permettendo di investigare l'insorgenza di *cluster* in uno scenario biologicamente più completo.

Nelle sezioni successive (1.2 e 1.3), si illustra nel dettaglio il metabolismo cellulare e la sua riprogrammazione, con il fine di fornirne un vademecum generale. Nella sezione 1.4, si illustra lo stato dell'arte della modellazione matematica.

1.2 Metabolismo Cellulare Fisiologico: Il Fenotipo Ossidativo

Il metabolismo cellulare è l'insieme delle reazioni biochimiche che avvengono all'interno della cellula. Da alcune di queste, essa ottiene le molecole e l'energia di cui necessita per mantenersi in vita, crescere, ripararsi e svolgere le sue funzioni specifiche; tra le quali, produrre energia utilizzabile, sintetizzare i mattoni cellulari e costruire e riparare se stessa [14, 15, 16, 25].

Nelle reazioni biochimiche del metabolismo cellulare, gli enzimi hanno un ruolo fondamentale come catalizzatori: ovvero, rendono possibili le reazioni in cui sono coinvolti, accelerandole e occupandosi di legare i substrati (molecole coinvolte nella reazione), favorendo le trasformazioni molecolari [17]. La via metabolica o *metabolic pathway* è l'insieme di queste reazioni in sequenza, dove i substrati vengono trasformati in prodotti che, a loro volta, diventano substrati per altri prodotti. In questi processi, ogni reazione biochimica è guidata da un enzima specifico.

Le cellule sono capaci di controllare le vie metaboliche sulla base delle loro necessità attraverso la via catabolica e la via anabolica. La prima degrada le molecole complesse nei loro costituenti e rilascia energia sotto forma di calore o conservata in altre molecole. La seconda sintetizza nuove macromolecole dai prodotti del catabolismo, utilizzando energia. L'equilibrio di queste due vie metaboliche garantisce alle cellule il controllo sui propri livelli di metaboliti essenziali e di energia [16].

Negli organismi eterotrofi, come l'uomo, l'energia chimica necessaria per sostenere la via anabolica viene assunta dai nutrienti prodotti da altri organismi. Questa energia è immagazzinata nei legami chimici delle macromolecole e, una volta liberata, diventa disponibile per le cellule. La rottura dei legami chimici delle molecole rilascia energia, che viene accumulata in molecole ad alta densità energetica, come l'adenosina trifosfato (ATP). La degradazione delle macromolecole dei nutrienti produce composti più piccoli, che vengono assorbiti dal circolo ematico e trasportati alle cellule che ne necessitano. L'insieme di questi processi costituiscono la respirazione cellulare aerobica. La prima fase della respirazione cellulare, la glicolisi, è un processo anaerobico che si svolge nei mitocondri e comporta la scissione di una molecola di glucosio in due molecole di piruvato, con una produzione netta di ATP. Successivamente, nel ciclo di Krebs, l'acetilcoenzima A, derivato dal metabolismo di carboidrati (glucosio), lipidi e proteine, viene completamente ossidato, producendo anidride carbonica, una piccola quantità di ATP e molecole trasportatrici di energia: Nicotinammide Adenina Dinucleotide (*NADH*) e Flavina Adenina Dinucleotide (*FADH₂*). Durante la fosforilazione ossidativa (OXPHOS), che avviene sulla membrana mitocondriale, i trasportatori di energia cedono elettroni

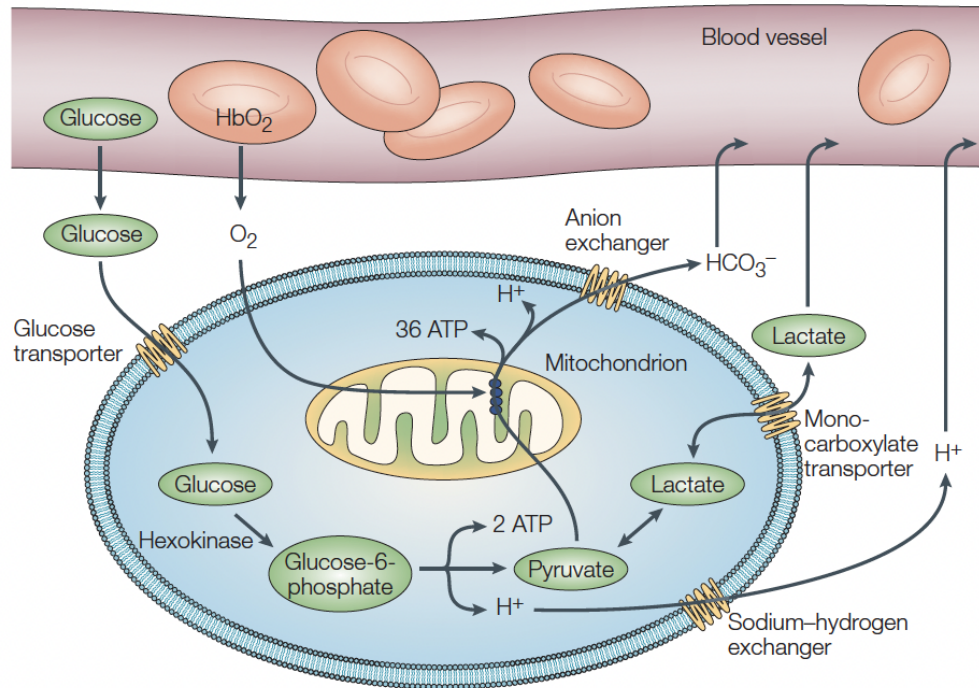


Figura 1.2: Panoramica sulla respirazione cellulare. I vasi portano il glucosio e l'ossigeno ai tessuti, dove raggiungono le cellule per diffusione. Il glucosio viene preso da specifici trasportatori e poi convertito prima in glucosio-6-fosfato dall'esochinasi e successivamente in piruvato, producendo due molecole di ATP. In presenza di ossigeno, il piruvato viene ossidato in HCO_3^- , generando 36 molecole di ATP in più per ogni molecola di glucosio. In assenza di ossigeno, il piruvato viene ridotto in lattato, il quale è espulso dalla cellula [8].

a una catena di trasporto, utilizzando l'ossigeno come accettore finale, producendo acqua e la maggior parte dell'ATP [16, 28]. La fosforilazione ossidativa rappresenta il metodo più efficiente per l'immagazzinamento di energia sotto forma di ATP, sebbene sia più lenta rispetto alla glicolisi anaerobica, con una resa di 36 molecole di ATP per ogni molecola di glucosio [8].

La disponibilità di ossigeno è un fattore cruciale nella regolazione del metabolismo energetico di una cellula sana, la quale in condizioni aerobiche massimizza la produzione di ATP reindirizzando il piruvato, prodotto dalla glicolisi citoplasmatica, verso i mitocondri per completare l'ossidazione. Il meccanismo di regolazione metabolica, detto effetto Pasteur, consiste proprio nell'inibizione della glicolisi in presenza di ossigeno, convertendo il piruvato in lattato e favorendo la via della fosforilazione ossidativa, molto più efficiente in termini energetici. Al contrario, in condizioni di ipossia, la fosforilazione ossidativa è bloccata e il piruvato rimane nel citoplasma, dove viene convertito in lattato per rigenerare il coenzima NAD^+ (Nicotinamide Adenina Dinucleotide, in forma ossidata) necessario a sostenere la

glicolisi (ossia, la trasformazione dei nutrienti in energia), l'unica via rimasta per produrre ATP [8, 10, 16, 21].

Dopo aver descritto il metabolismo fisiologico, è possibile comprendere meglio come le cellule tumorali lo riprogrammino per adattarsi alla loro crescita incontrollata.

1.3 La Riprogrammazione del Metabolismo Energetico

Le cellule tumorali devono attuare una profonda riprogrammazione del proprio metabolismo per sostenere la loro crescita e proliferazione incontrollata (vedi figura 1.2). Questa alterazione, oggi considerata uno dei tratti distintivi del cancro, non è un semplice effetto collaterale della trasformazione maligna, ma un adattamento attivo e necessario che fornisce alle cellule cancerose l'energia, i mattoni biosintetici e il controllo REDOX (reazioni chimiche di ossidoriduzione) indispensabili per la loro sopravvivenza e crescita. L'effetto Warburg è il fenomeno caratteristico di questa riprogrammazione metabolica [15, 16, 28].

Negli anni '20, Warburg osservò che le cellule tumorali, per sostenere la loro rapida crescita e proliferazione, assorbono grandi quantità di glucosio e ne convertono gran parte in lattato attraverso la glicolisi, anche in presenza di ossigeno. Questo processo, noto come glicolisi aerobica o Effetto Warburg, consente una produzione rapida, sebbene inefficiente, di ATP, fornisce intermedi per la biosintesi e rigenera il necessario NAD^+ per mantenere l'elevato flusso glicolitico. Warburg ipotizzò che questo comportamento fosse dovuto a un danno irreversibile alla respirazione mitocondriale: tuttavia, la ricerca moderna è arrivata alla conclusione che i mitocondri sono funzionali ed essenziali per la sopravvivenza della cellula cancerosa. Pertanto, la glicolisi aerobica rappresenta una via metabolica mirata e costituisce un preciso vantaggio selettivo per le cellule maligne, che devono duplicarsi velocemente in un microambiente in cui il glucosio è una risorsa che genera competitività tra le cellule. Il vantaggio principale di questo metabolismo risiede nella sua rapidità. Rispetto alla fosforilazione ossidativa, la glicolisi aerobica è da 10 a 100 volte più veloce [20], rispondendo così, alla necessità del tumore di crescere ed espandersi nel minor tempo possibile. Inoltre con esso, la cellula si sostiene anche dal punto di vista biosintetico e di mantenimento dell'equilibrio ossidativo (REDOX), essenziale per mantenere il funzionamento della glicolisi. Le cellule in rapida proliferazione producono molte specie reattive con l'ossigeno che possono causare stress ossidativo e danneggiare il DNA, le proteine e i lipidi. Ciò, è un ulteriore fattore che può indurre apoptosi o mutazioni. Per proteggersi, una delle principali fonti del potere riducente della cellula è la via del pentoso fosfato, alimentata dal flusso glicolitico [8, 11, 15, 20].

Il microambiente tumorale (TME), come schematizzato in figura 1.3, è un ecosistema in continuo movimento che cambia aspetto e funzione nel corso della malattia, ed è in relazione simbiotica alla massa tumorale. Infatti, essi comunicano costantemente per favorire la crescita e metastasi. Secondo molte ricerche, il microambiente tumorale è immunodepressivo, creando condizioni che sopprimono o eludono la risposta immunitaria antitumorale. Per di più, esso presenta condizioni

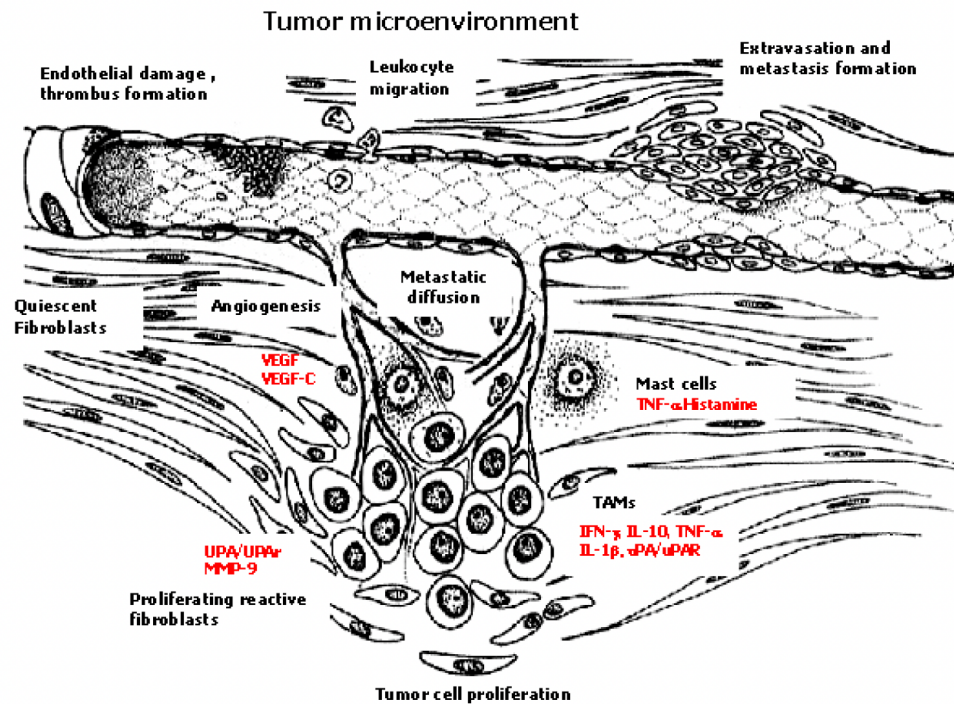


Figura 1.3: Panoramica sul microambiente tumorale o TME. In particolare, si evidenziano le principali caratteristiche biologiche della massa tumorale: proliferazione delle cellule maligne, angiogenesi, diffusione ed attività metastatica [12].

di ipossia e acidosi, aspetti che facilitano la fase di metastasi e la farmacoresistenza [15] [17] [8]. Secondo alcune ricerche, il microambiente meccanico all'interno di quello tumorale può influenzare la durezza del tessuto cellulare e l'espressione dei geni, alcuni dei quali possono favorire la metastasi [28].

Una delle conseguenze metaboliche più rilevanti, che contribuisce a modellare il microambiente tumorale, è la continua produzione di lattato e ioni H^+ , i quali acidificano progressivamente l'ambiente extracellulare circostante. Il pH acido, tra 6.5-6.9, è un amplificatore e promotore dell'invasione e progressione del tumore (metastasi). Infatti, secondo l'invasione mediata dell'acido, si hanno: tossicità selettiva (le cellule adiacenti alla massa tumorale subiscono apoptosi, creando spazio fisico per l'espansione del tumore), degradazione della matrice extra-cellulare (facilitando la migrazione e invasione delle cellule maligne) e soppressione immunitaria (ovvero, l'ambiente acido inibisce la funzione del sistema immunitario, come i linfociti T, aiutando il tumore a eludere le difese immunitarie) [8, 10, 14, 28].

Il metabolismo del cancro è estremamente eterogeneo, all'interno dello stesso tumore coesistono popolazioni cellulari con profili metabolici diversi. Questa caratteristica ha portato all'elaborazione del modello di simbiosi metabolica o Reverse

Warburg. Ovvero, una popolazione di cellule tumorali sfrutta prevalentemente la glicolisi aerobica e produce grandi quantità di lattato, tipicamente in zone in condizioni di ipossia; un'altra popolazione di cellule tumorali è prevalentemente ossidativa, tipicamente in zone ben ossigenate come in prossimità dei vasi sanguigni, e, assorbendo il lattato dalle prime, utilizza la fosforilazione ossidativa, risparmiando glucosio [8, 16, 21, 28].

In conclusione, il metabolismo riprogrammato delle cellule cancerose è una strategia evolutiva multi-funzione che fornisce energia rapidamente, i precursori per la crescita e la protezione dallo stress ossidativo, rimodellando al contempo il microambiente per favorire la metastasi [10, 20, 25]. Data la complessità di queste interazioni metaboliche e spaziali, l'intuizione biologica da sola non è sufficiente per prevedere l'evoluzione del sistema. La modellazione matematica offre, quindi, uno strumento potente per effettuare previsioni sull'evoluzione spazio-temporale delle cellule tumorali.

1.4 Stato dell'arte: Modellazione Matematica

In generale, sono tre gli approcci consolidati nella modellazione di processi come quello di invasione oncologica: i modelli continui, discreti e ibridi. I modelli continui trattano le popolazioni cellulari e le concentrazioni chimiche come campi continui. Storicamente, le equazioni differenziali ordinarie (*ODE*) sono state il primo strumento matematico ad essere implementato per descrivere la crescita globale del tumore nel tempo con leggi esponenziale e logistica, assumendo implicitamente che il microambiente sia uniforme e ben mescolato. Per descrivere l'eterogeneità spaziale che caratterizza i processi di invasione e metastasi, la modellazione matematica si è spostata verso le equazioni alle derivate parziali (*PDE*). Tra queste, i modelli di reazione-diffusione sono uno standard consolidato, dove il termine diffusivo simula il movimento casuale di cellule e la dispersione di nutrienti, mentre il termine di reazione descrive i processi locali come la proliferazione, la morte cellulare e il consumo di nutrienti [23]. I modelli discreti simulano il comportamento di singole cellule secondo regole probabilistiche (come gli atomi cellulari o i modelli *agent-based*), riuscendo a catturare l'eterogeneità stocastica a livello cellulare e le interazioni dirette cellula-cellula. Tuttavia, il costo computazionale necessario alla loro applicazione è molto elevato e ciò limita il loro utilizzo su scale tessutali ampie [23]. I modelli ibridi combinano i due approcci precedenti, ad esempio, trattando le cellule come entità discrete e le sostanze chimiche come campi continui [23, 27].

Ad oggi, l'approccio continuo di reazione-diffusione costituisce la scelta più robusta e analiticamente trattabile per lo studio delle dinamiche macroscopiche di invasione, guidate dal metabolismo e dall'acidità [23]. Nel 1996, Gatenby e Gawlin-ski [3] hanno posto le fondamenta nella comprensione del ruolo del metabolismo nell'invasione tumorale con l'ipotesi dell'invasione mediata dell'acidità, suggerendo che l'adozione della glicolisi aerobica come via metabolica cellulare sia un meccanismo attivo, e non solo una risposta adattativa, che conferisce un vantaggio competitivo alle cellule tumorali [3]. In sostanza, descrivono l'invasione tumorale guidata dall'acidificazione del microambiente, dove l'acido prodotto dalla glicolisi uccide le cellule sane circostanti, favorendo le cellule tumorali resistenti all'acido. Il loro modello si basa su un sistema di tre equazioni di reazione-diffusione accoppiate che descrivono la densità di tessuto sano N_1 , la densità di tessuto neoplastico N_2 e la concentrazione in eccesso di ioni H^+ , indicata con L [3]. La dinamica del tessuto sano è descritta da una crescita logistica, limitata dalla competizione spaziale con il tumore e da un termine di morte indotta dall'acidità:

$$\frac{\partial N_1}{\partial t} = r_1 N_1 \left(1 - \frac{N_1}{K_1} - \alpha_{12} \frac{N_2}{K_2} \right) - d_1 L N_1 + \nabla \cdot (D_{N_1} [N_2] \nabla N_1) \quad (1.1)$$

$$D_{N_1} [N_2] = 0 \quad (1.2)$$

Dove il termine $d_1 L N_1$ rappresenta la morte delle cellule sane, indotta dall'ambiente acido, e la condizione 1.2 descrive la diffusione spaziale delle cellule normali [3].

Il tessuto maligno N_2 evolve similmente ad N_1 secondo:

$$\frac{\partial N_2}{\partial t} = r_2 N_2 \left(1 - \frac{N_2}{K_2} - \alpha_{21} \frac{N_1}{K_1} \right) + \nabla \cdot (D_{N_2} [N_1] \nabla N_2) \quad (1.3)$$

$$D_{N_2} [N_1] = D_2 (1 - N_1/K_1) \quad (1.4)$$

L'equazione 1.3 non presenta il termine di morte indotta dall'acidificazione del microambiente con lo scopo di descrivere un fenotipo resistente. Secondo la condizione 1.4, la diffusione delle cellule cancerose è possibile solo dove il tessuto sano è stato degradato o è assente [3]. L'equazione per l'acidità descrive la produzione di ioni H^+ , la loro diffusione nel tessuto circostante e la rimozione da parte del sistema vascolare come [3]:

$$\frac{\partial L}{\partial t} = r_3 N_2 - d_3 L + D_3 \nabla^2 L \quad (1.5)$$

L'analisi di questo modello ha portato a una previsione teorica cruciale: l'esistenza di un vuoto interstiziale all'interfaccia tumore-ospite. I protoni H^+ diffondono più velocemente delle cellule, attraversando il tessuto sano adiacente e causandone la morte anticipata, ovvero prima che le cellule maligne vi arrivino fisicamente. Ciò crea uno spazio vuoto che facilita la successiva avanzata del fronte tumorale. Questa previsione è stata successivamente validata da osservazioni istologiche su campioni umani in vitro. [3]

Successivamente, Gatenby e Vincent [6] arricchiscono la modellazione del cancro integrando principi di biologia evolutiva e teoria dei giochi. Essi hanno formalizzato matematicamente la carcinogenesi utilizzando le funzioni generatrici di *fitness* o *G-functions* per descrivere la stabilità evolutiva delle popolazioni cellulari. Nel loro modello, le cellule sane occupano un picco di *fitness* in un paesaggio adattativo. Mutazioni o alterazioni ambientali deformano questo paesaggio, rendendo il fenotipo sano instabile e favorendo l'emergere di nuove strategie di proliferazione [6].

Secondo Gatenby e Gillies [8], l'ipossia e l'acidosi guidano l'evoluzione del tumore. La proliferazione incontrollata delle cellule tumorali porta ad un aumento della massa tumorale, che inevitabilmente genera gradienti di diffusione nella distribuzione di ossigeno e nutrienti. Questo processo svantaggia le cellule al suo interno, allontanandole dai vasi sanguigni. Ciò induce alla selezione di cloni capaci di sopravvivere e proliferare anche in un microambiente poco ossigenato (effetto Warburg). Questa selezione favorisce la glicolisi, che a sua volta conduce all'acidosi e seleziona ulteriormente i fenotipi resistenti alle condizioni acide, i quali adottano una strategia evolutiva stabile. Una volta che la popolazione tumorale ha acidificato

Tabella 1.1: Valori dei parametri fisici e relative descrizioni biologiche del lavoro del 1996 di Gatenby et al. [3].

Parametro	Valore	Descrizione Biologica
K_1, K_2	$5 \cdot 10^7 / \text{cm}^3$	Capacità portante: densità cellulare massima sostenibile dal tessuto.
r_1, r_2	$1 \cdot 10^{-6} / \text{s}$	Tasso di crescita intrinseco delle popolazioni cellulari.
D_2	$2 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2 / \text{s}$	Coefficiente di diffusione delle cellule tumorali nel tessuto.
D_3	$5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{s}$	Coefficiente di diffusione degli ioni idrogeno.
r_3	$2.2 \cdot 10^{-17} \text{ M} \cdot \text{cm}^3 / \text{s}$	Tasso di produzione di acidità (ioni H^+) per unità di densità tumorale.
d_3	$1.1 \cdot 10^{-4} / \text{s}$	Tasso di clearance: velocità di smaltimento dell'acido tramite i vasi.
d_1	$0 \Rightarrow 10 / \text{M} \cdot \text{s}$	Sensibilità cellulare: parametro di morte indotta dal calo del pH ambientale.

il microambiente, le cellule sane non possono più competere e vengono escluse, facilitando così l'invasione.

L'articolo di McGillen et al. del 2014 [19] approfondisce le conseguenze del metabolismo energetico alterato nei tumori, estendendo il modello di Gatenby et al. (1996) [3]. Gli autori valutano l'ipotesi che l'invasione tumorale mediata dall'acidità possa spiegare la diffusione dell'effetto Warburg nei tumori, introducendo dei termini biologicamente motivati per rappresentare una gamma più ampia di comportamenti tumorali. Le principali innovazioni riguardano la competizione per risorse e spazio tra le cellule sane e tumorali, nonché la resistenza acida incompleta, secondo cui anche le cellule tumorali presentano una soglia di tolleranza al pH acido. McGillen et al. identificano quattro tipologie di comportamento tumorale: invasione eterogenea (avanzamento aggressivo del tumore), invasione omogenea (avanzamento con densità uniforme), tumore non aggressivo (sopravvivenza con crescita molto lenta o stabilità prolungata, comportamento non previsto dal modello del 1996), *clearance* del tumore (eliminazione del tumore da parte del tessuto sano).

Dalle equazioni 1.6 risultano evidenti le modifiche appena discusse:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial U}{\partial T} &= \underbrace{\rho_1 U \left(1 - \frac{U}{\kappa_1} - \alpha_2 \frac{V}{\kappa_1}\right)}_{\text{crescita logistica con competizione cellulare}} - \underbrace{\delta_1 U W}_{\text{morte cellule sane mediata dall'acido}} \\
 \frac{\partial V}{\partial T} &= \underbrace{\rho_2 V \left(1 - \frac{V}{\kappa_2} - \alpha_1 \frac{U}{\kappa_2}\right)}_{\text{crescita logistica con competizione cellulare}} - \underbrace{\delta_2 V W}_{\text{morte cellule tumorali mediata dall'acido}} + \underbrace{\frac{\partial}{\partial X} \left[\Delta_2 \left(1 - \frac{U}{\kappa_1}\right) \frac{\partial V}{\partial X} \right]}_{\text{diffusione cellule tumorali limitata dalla densità}} \quad (1.6) \\
 \frac{\partial W}{\partial T} &= \underbrace{\rho_3 V - \delta_3 W}_{\text{produzione acida e rimozione vascolare delle cellule tumorali}} + \underbrace{\Delta_3 \frac{\partial^2 W}{\partial X^2}}_{\text{diffusione chimica dell'acido}}
 \end{aligned}$$

Dove $U(X, T)$ è la densità delle cellule sane, $V(X, T)$ è la densità delle cellule tumorali e $W(X, T)$ è la concentrazione di acido lattico in eccesso rispetto alla normale concentrazione acida. Riscaldando opportunamente le variabili e i parametri del sistema 1.6, si ottiene il seguente modello adimensionale:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial u}{\partial t} &= u(1 - u - a_2 v) - d_1 u w \\
 \frac{\partial v}{\partial t} &= r_2 v(1 - v - a_1 u) - d_2 v w + D \frac{\partial}{\partial x} \left[(1 - u) \frac{\partial v}{\partial x} \right] \\
 \frac{\partial w}{\partial t} &= c(v - w) + \frac{\partial^2 w}{\partial x^2}
 \end{aligned} \quad (1.7)$$

Dove $a_{1,2}$ rappresentano la forza competitiva del tumore e delle cellule sane, rispettivamente; $d_{1,2}$ rappresentano la sensibilità delle cellule sane e del tumore all'acido, rispettivamente; r_2 rappresenta il rapporto tra i tassi di proliferazione (ρ_1 e ρ_2); c rappresenta il rapporto tra la rimozione dell'acido (δ_3) e la proliferazione (ρ_1); e D è il rapporto tra i coefficienti di diffusione (Δ_2, Δ_3).

La letteratura evidenzia come la modellazione matematica abbia svolto, e svolga tuttora, un ruolo chiave nel definire il cancro come un processo evolutivo, in cui il metabolismo riprogrammato e l'acidità sono dei *driver* fondamentali.

Obiettivi e Struttura

Nel prossimo Capitolo 2 si introducono i modelli matematici di reazione-diffusione sviluppati per descrivere la formazione e evoluzione di *cluster* di cellule tumorali con eterogeneità metabolica pH-dipendente, analizzando come le variazioni locali di acidità influenzano la distribuzione e la cooperazione tra le diverse popolazioni cellulari. Nel Capitolo 3 si esporranno i risultati ottenuti dalle simulazioni numeriche dei modelli implementati nel *software* COMSOL Multiphysics®, dove si evidenzieranno le loro capacità di generare dei *cluster* cellulari eterogenei. Il Capitolo 4 conterrà le conclusioni, la sintesi dei risultati numerici, la loro interpretazione dal punto di vista biologico e verranno discussi i limiti del presente studio e le sue implicazioni.

Capitolo 2

Il modello matematico

2.1 Dai Pattern nella Vegetazione ai Pattern nell'Oncologia

La genesi del modello matematico proposto in questa tesi trae ispirazione dallo studio dei sistemi dinamici in ecologia, in particolare dai modelli di reazione-diffusione utilizzati per descrivere la formazione di *pattern* di vegetazione in ambienti semi-aridi o stressati. Come discusso in Marasco et al. [18], la distribuzione spaziale delle piante non è sempre omogenea, ma tende ad auto-organizzarsi in strutture complesse (*cluster*, strisce, *spot*) a causa di meccanismi di *feedback* pianta-suolo.

Il modello di riferimento considera l'interazione tra tre componenti fondamentali: la biomassa vegetale (B), che cresce logisticamente consumando risorse; l'acqua (W), risorsa limitante necessaria alla crescita; la tossicità del suolo (T), prodotta dalla decomposizione della biomassa stessa, che ne inibisce la crescita e ne induce la morte. Il sistema di equazioni differenziali è il seguente:

$$\begin{cases} \frac{\partial B}{\partial t} = D_B \nabla^2 B + f_B(B, W, T), & f_B = cB^2W - (d + sT)B \\ \frac{\partial W}{\partial t} = D_W \nabla^2 W + f_W(B, W), & f_W = p - rB^2W - lW \\ \frac{\partial T}{\partial t} = f_T(B, T), & f_T = q(d + sT)B - (k + wp)T \end{cases} \quad (2.1)$$

L'aspetto cruciale di questo sistema è il meccanismo di autotossicità: il processo di decomposizione della vegetazione ormai morta aumenta la tossicità del suolo, forzando la biomassa a morire o a migrare (diffondere) verso zone meno inquinate. Matematicamente, questo è descritto da un termine di decadimento della biomassa dipendente dalla tossicità:

$$\frac{\partial B}{\partial t} \propto -sTB \quad (2.2)$$

dove s è la sensibilità della pianta alla tossicità del terreno. È stato dimostrato che questo termine di accoppiamento non lineare, combinato con la diffusione, è sufficiente a generare instabilità di Turing, portando alla rottura della simmetria spaziale e all'emergere di *pattern*.

2.2 Il Modello di Reazione - Diffusione

In questo lavoro di tesi, si intende traslare la dinamica proposta per il modello di vegetazione al contesto oncologico. Il microambiente tumorale presenta dinamiche sorprendentemente simili: le cellule tumorali, attraverso un metabolismo alterato, modificano l'ambiente circostante rendendolo ostile. In altre parole, ci si avvale di un sistema già collaudato, per descrivere la competizione per le risorse in ecologia, per caratterizzare la competizione per lo spazio in oncologia. Nel contesto tumorale, la "tossicità" è rappresentata dall'accumulo di ioni H^+ (acidosi) dovuto all'effetto Warburg. Analogamente a come la tossicità del suolo uccide la vegetazione sensibile, l'acidosi induce apoptosi nelle cellule sane e seleziona cloni tumorali resistenti. L'ipotesi centrale di questo lavoro è che, proprio come nella maggior parte dei sistemi ecologici, e nelle cellule tumorali in minor parte, questo *feedback* negativo mediato dal microambiente sia il motore matematico che guida la formazione di *cluster* di cellule tumorali e l'invasione tissutale. Basandosi su questa analogia e sulla letteratura oncologica, si sono formulati i seguenti modelli fisici ad una popolazione cellulare maligna C e due popolazioni cellulari in competizione, dove in nessuno dei due casi si è descritta la selezione dei cloni. Le cellule sane sono C_H e quelle tumorali C_T , espresse in numero di cellule presenti in un volume [cells/cm³]. I nutrienti N e l'acidità H sono espressi in molarità [M].

Segue il primo modello ad una popolazione:

$$\begin{cases} \frac{\partial C}{\partial t} = D_C \nabla^2 C + f_C(C, N, H), & f_C = \gamma_T C^2 N - (d_T + s_T H)C \\ \frac{\partial N}{\partial t} = D_N \nabla^2 N + f_N(C, N), & f_N = \delta_v - r_T C^2 N - \delta N \\ \frac{\partial H}{\partial t} = D_H \nabla^2 H + f_H(C, H), & f_H = q(d_T + s_T H)C - (k + w\delta_v)H \end{cases} \quad (2.3)$$

Dove, la proliferazione cellulare ($\gamma_T C^2 N$) è legata ai nutrienti; la morte è associata a d_T , che rappresenta l'apoptosi, e $s_T H$, che è la morte associata all'acidità del TME (*Tumor Micro-Environment*) che colpisce anche le cellule tumorali, seppur in minor misura delle cellule sane. Il termine $-r_T C^2 N$ è il consumo di nutrienti legato alla proliferazione cellulare, mentre δ_v è una sorgente legata alla presenza di un sistema di vasi omogeneizzato in vivo e $-\delta N$ un *washout* costante dei nutrienti stessi. Nell'equazione della dinamica dell'acidità, $q(d_T + s_T H)C$ è legato alla

morte cellulare, mentre $-(k + w\delta_v)$ è la rimozione da decadimento sommata al *clearance* da parte dei vasi, rispettivamente.

Si espone ora il secondo modello a due popolazioni cellulari con l'obiettivo di rendere la descrizione biologica del fenomeno di formazione dei *pattern* tumorali più realistica, aggiungendo un'equazione per descrivere la dinamica delle cellule sane in relazione a quelle neoplastiche:

$$\begin{cases} \frac{\partial C_H}{\partial t} = D_C \nabla^2 C_H + f_{C_H}(C_H, N, H) \\ \frac{\partial C_T}{\partial t} = D_C \nabla^2 C_T + f_{C_T}(C_T, N, H) \\ \frac{\partial N}{\partial t} = D_N \nabla^2 N + f_N(C_H, C_T, N) \\ \frac{\partial H}{\partial t} = D_H \nabla^2 H + f_H(C_T, H) \end{cases} \quad (2.4a)$$

Dove i termini di reazione sono:

$$f_{C_H} = \gamma_H C_H^\zeta N - \varepsilon_{HT} C_H - (d_H + s_H H) C_H - \chi C_H C_T \quad (2.4b)$$

$$f_{C_T} = \gamma_T C_T^\varphi N + \varepsilon_{HT} C_H - (d_T + s_T H) C_T \quad (2.4c)$$

$$f_N = \delta_v - r_H C_H^\zeta N - r_T C_T^\varphi N - \delta N \quad (2.4d)$$

$$f_H = q (d_T + s_T H) C_T - (k + w\delta_v) H \quad (2.4e)$$

Dove, $s_T \ll s_H$ coerentemente a quanto esposto delle caratteristiche del cancro nella Sezione 1.1: infatti, l'acidificazione del microambiente esercita una pressione selettiva che favorisce l'emergere di fenotipi tumorali resistenti al pH acido, poiché la glicolisi aerobica rappresenta per essi un preciso vantaggio adattativo [8]. Al contrario, le cellule sane, non essendo sottoposte a tale pressione selettiva, restano fortemente vulnerabili alla tossicità indotta dall'acido, coerentemente con l'ipotesi dell'invasione mediata dall'acido [3]. Questa asimmetria evolutiva giustifica l'assunzione $s_T \ll s_H$ nel modello, i quali sono valori costanti e non descrivono la dinamica di selezione dei fenotipi/cloni acido-resistenti. In aggiunta, rispetto al precedente modello (2.3), si ha un tasso di transizione ε_{HT} da un fenotipo sano ad uno tumorale ($H \rightarrow T$) e, per le sole C_H , un termine di morte indotta dal contatto con C_T , $(-\chi C_H C_T)$, in cui χ è il coefficiente di competizione fra le cellule dove le tumorali uccidono le sane. La scelta di inserire questo ultimo termine solo per le cellule sane è motivata dalla biologia delle cellule tumorali. Nello specifico, quest'ultime evadono l'inibizione da contatto, un meccanismo fisiologico che normalmente arresta la proliferazione delle cellule quando entrano in contatto con cellule vicine [15].

Si osservi che nel termine di reazione (2.4e), la produzione di acido è modellata come proporzionale al termine di morte delle cellule tumorali, $(d_T +$

$s_T H)C_T$, e non al tasso di attività glicolitica delle cellule vive. Tale scelta, ereditata dall'impostazione originaria del modello, costituisce una semplificazione discutibile: infatti, biologicamente la produzione di lattato e ioni H^+ è legata all'effetto Warburg, quindi al metabolismo delle cellule tumorali, e non alla loro morte. Si è scelto comunque di mantenere questa formulazione per coerenza con la struttura del modello e per la sua semplicità analitica.

Nelle sezioni 2.3 e 2.4, si espongono le analisi adimensionali e di stabilità riguardanti i sistemi di equazioni alle derivate parziali (2.3 e 2.4) appena discussi.

2.3 Modello Adimensionale a Singola Popolazione

Il sistema di tre equazioni fisiche 2.3, dopo opportune manipolazioni algebriche, è equivalente al seguente sistema di equazioni adimensionali:

$$\begin{cases} \frac{\partial c}{\partial \tau} = \mu \nabla_\xi^2 c + \gamma_t c^2 n - (\alpha_t + \beta_t h) c \\ \frac{\partial n}{\partial \tau} = \nabla_\xi^2 n + 1 - \gamma_t c^2 n - \lambda n \\ \frac{\partial h}{\partial \tau} = \psi \nabla_\xi^2 h + \alpha_t c - (1 - \beta_t c) h \end{cases} \quad (2.5)$$

Nella sezione successiva 2.3.1, si approfondiscono i passaggi algebrici che hanno condotto al sistema 2.5. In Tabella 2.1, si anticipano la definizione dei parametri e la loro funzione biologica associata.

Tabella 2.1: Parametri adimensionali del modello 2.5.

Parametro	Definizione	Significato Biologico
μ	D_C/D_N	Rapporto di diffusione per le cellule tumorali.
ψ	D_H/D_N	Rapporto di diffusione per gli ioni H^+ .
γ_t	$\frac{\gamma_T^2 \delta_v^2}{K^3 r_T}$	Proliferazione cellulare.
α_t	$\frac{d_T}{K}$	Tasso di morte naturale (apoptosi).
β_t	$\frac{s_T \gamma_T \delta_v q}{K^2 r_T}$	Sensibilità cellulare agli ioni H^+ .
λ	$\frac{\delta}{K}$	Apporto vascolare dei nutrienti.

2.3.1 Analisi Dimensionale

Si procede ora ad illustrare la derivazione del modello adimensionale 2.5. Per slegare le variabili e i parametri del sistema 2.3 dalle loro grandezze fisiche e identificare i parametri dominanti, si introducono le seguenti variabili adimensionali:

$$c = \frac{Kr_T}{\gamma_T \delta_v} C, \quad n = \frac{K}{\delta_v} N, \quad h = \frac{Kr_T}{\gamma_T \delta_v q} H, \quad \tau = Kt, \quad \xi = \mathbf{x} \sqrt{\frac{K}{D_N}}$$

dove $K = (k + w\delta_v)$ è il tasso di *clearance* totale dell'acido.
Partendo dall'equazione fisica per le cellule neoplastiche:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_C \nabla^2 C + \gamma_T C^2 N - (d_T + s_T H) C$$

Sostituendo le variabili di scala:

$$\frac{\gamma_T \delta_v}{r_T} \frac{\partial c}{\partial \tau} = \frac{D_C}{D_N} \frac{\gamma_T \delta_v}{r_T} \nabla_\xi^2 c + \frac{\gamma_T^3 \delta_v^3}{K^3 r_T^2} c^2 n - \left(d_T + s_T \frac{\gamma_T \delta_v q}{K r_T} h \right) \frac{\gamma_T \delta_v}{K r_T} c$$

Con le opportune semplificazioni, si ottiene:

$$\frac{\partial c}{\partial \tau} = \frac{D_C}{D_N} \nabla_\xi^2 c + \frac{\gamma_T^2 \delta_v^2}{K^3 r_T} c^2 n - \left(\frac{d_T}{K} + \frac{s_T \gamma_T \delta_v q}{K^2 r_T} h \right) c$$

Definendo i parametri adimensionali:

$$\mu = \frac{D_C}{D_N}, \quad \gamma_t = \frac{\gamma_T^2 \delta_v^2}{K^3 r_T}, \quad \alpha_t = \frac{d_T}{K}, \quad \beta_t = \frac{s_T \gamma_T \delta_v q}{K^2 r_T}$$

Si ottiene, così, la seguente equazione adimensionale:

$$\frac{\partial c}{\partial \tau} = \mu \nabla_\xi^2 c + \gamma_t c^2 n - (\alpha_t + \beta_t h) c \quad (2.6)$$

Dall'equazione fisica dei nutrienti:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = D_N \nabla^2 N + \delta_v - r_T C^2 N - \delta N$$

Sostituendo le variabili di scala:

$$\delta_v \frac{\partial n}{\partial \tau} = \frac{D_N}{D_N} \nabla_\xi^2 n + \delta_v - r_T \frac{\gamma_T^2 \delta_v^3}{K^3 r_T^2} c^2 n - \frac{\delta}{K} \delta_v n$$

Dividendo opportunamente:

$$\frac{\partial n}{\partial \tau} = \nabla_\xi^2 n + 1 - \frac{\gamma_T^2 \delta_v^2}{K^3 r_T} c^2 n - \frac{\delta}{K} n$$

Definendo il parametro adimensionale:

$$\lambda = \frac{\delta}{K}$$

Si ottiene, così, la seguente equazione adimensionale:

$$\frac{\partial n}{\partial \tau} = \nabla_{\xi}^2 n + 1 - \gamma_t c^2 n - \lambda n \quad (2.7)$$

Infine, dall'equazione fisica dell'acidità:

$$\frac{\partial H}{\partial t} = D_H \nabla^2 H + q(d_T + s_T H)C - KH$$

Sostituendo le variabili di scala:

$$\frac{\gamma_T \delta_v q}{r_T} \frac{\partial h}{\partial \tau} = \frac{D_H}{D_N} \frac{\gamma_T \delta_v q}{r_T} \nabla_{\xi}^2 h + q(d_T + s_T h) \frac{\gamma_T \delta_v}{K r_T} c - K \frac{\gamma_T \delta_v q}{K r_T} h$$

Dividendo opportunamente:

$$\frac{\partial h}{\partial \tau} = \frac{D_H}{D_N} \nabla_{\xi}^2 h + \left(\frac{d_T}{K} + \frac{s_T \gamma_T \delta_v q}{K^2 r_T} h \right) c - \frac{K}{K} h$$

Definendo il parametro adimensionale:

$$\psi = \frac{D_H}{D_N}$$

Si ottiene l'equazione adimensionale:

$$\begin{aligned} \frac{\partial h}{\partial \tau} &= \psi \nabla_{\xi}^2 h + \alpha_t c + \beta_t c h - h \\ &= \psi \nabla_{\xi}^2 h + \alpha_t c - (1 - \beta_t c) h \end{aligned} \quad (2.8)$$

Si procede ora all'analisi di stabilità lineare del modello adimensionale appena discusso.

2.3.2 Analisi di Stabilità Lineare

Seguendo l'approccio dell'analisi di stabilità lineare [7, 30], applicato al sistema 2.5, si inizia con l'individuazione degli stati di equilibrio omogenei. Siano (c^*, n^*, h^*) le soluzioni costanti nello spazio e nel tempo, ricavate dalla risoluzione delle equazioni omogenee:

$$f_c = \gamma_t c^2 n - (\alpha_t + \beta_t h) c = 0 \quad (2.9a)$$

$$f_n = 1 - \gamma_t c^2 n - \lambda n = 0 \quad (2.9b)$$

$$f_h = \alpha_t c - (1 - \beta_t c) h = 0 \quad (2.9c)$$

Il sistema dopo alcune manipolazioni e conti algebrici diventa:

$$c^* [\gamma_t(\alpha_t + \beta_t)c_*^2 - \gamma_t c^* + \alpha_t \lambda] = 0 \quad (2.10)$$

$$n^* = \frac{1}{\gamma_t c_*^2 + \lambda} \quad (2.11)$$

$$h^* = \frac{\alpha_t c^*}{1 - \beta_t c^*} \quad (2.12)$$

Dove, per garantire la positività di h^* , deve accadere che $h^* > 0 \Leftrightarrow 1 - \beta_t c^* > 0$.

Il primo punto di equilibrio è banale e $c_1^* = 0$ restituisce:

$$(c_1^*, n_1^*, h_1^*) = (0, 1/\lambda, 0) \quad (2.13)$$

Mentre l'equazione quadratica restituisce due punti reali e distinti $c_{2,3}^*$ solo se il discriminante è strettamente positivo, ovvero per:

$$\gamma_t(\gamma_t - 4\alpha_t\lambda(\alpha_t + \beta_t)) > 0 \Leftrightarrow \gamma_t > 4\alpha_t\lambda(\alpha_t + \beta_t) \quad (2.14)$$

Si ottengono, dunque, le soluzioni:

$$\begin{aligned} c_{2,3}^* &= \frac{\gamma_t \pm \sqrt{\gamma_t(\gamma_t - 4\alpha_t\lambda(\alpha_t + \beta_t))}}{2\gamma_t(\alpha_t + \beta_t)} \\ &= \frac{\gamma_t \pm \Delta}{2\gamma_t(\alpha_t + \beta_t)}, \text{ dove } \Delta = \sqrt{\gamma_t(\gamma_t - 4\alpha_t\lambda(\alpha_t + \beta_t))} \\ n_{2,3}^* &= \frac{4\gamma_t(\alpha_t + \beta_t)^2}{(\gamma_t \pm \Delta)^2 + 4\gamma_t\lambda(\alpha_t + \beta_t)^2} \\ h_{2,3}^* &= \frac{\alpha_t(\gamma_t \pm \Delta)}{2\gamma_t(\alpha_t + \beta_t) - \beta_t(\gamma_t \pm \Delta)} \end{aligned}$$

Riscrivendo i punti di equilibrio, si ha:

$$(c_2^*, n_2^*, h_2^*) = \left(\frac{\gamma_t + \Delta}{2\gamma_t(\alpha_t + \beta_t)}, \frac{2\beta_t\lambda(\alpha_t + \beta_t) + \gamma_t - \Delta}{2\lambda(\beta_t^2\lambda + \gamma_t)}, \frac{-2\alpha_t\beta_t\lambda + \gamma_t + \Delta}{2(\beta_t^2\lambda + \gamma_t)} \right) \quad (2.15)$$

$$(c_3^*, n_3^*, h_3^*) = \left(\frac{\gamma_t - \Delta}{2\gamma_t(\alpha_t + \beta_t)}, \frac{2\beta_t\lambda(\alpha_t + \beta_t) + \gamma_t + \Delta}{2\lambda(\beta_t^2\lambda + \gamma_t)}, \frac{-2\alpha_t\beta_t\lambda + \gamma_t - \Delta}{2(\beta_t^2\lambda + \gamma_t)} \right) \quad (2.16)$$

Stabiliti gli equilibri omogenei, se ne studia ora la stabilità rispetto a piccole perturbazioni. Si pone:

$$\begin{pmatrix} c(\boldsymbol{\xi}, \tau) \\ n(\boldsymbol{\xi}, \tau) \\ h(\boldsymbol{\xi}, \tau) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} c^* \\ n^* \\ h^* \end{pmatrix} + \eta \mathbf{u}(\boldsymbol{\xi}, \tau), \quad \|\eta \mathbf{u}\| \ll 1, \quad (2.17)$$

con $\eta \mathbf{u} = (\eta c, \eta n, \eta h)^\top$. Sostituendo (2.17) nel sistema (2.5) e considerando i soli termini al primo ordine in $\eta \mathbf{u}$, si ottiene il sistema linearizzato [7, par. 2.3]:

$$\frac{\partial \eta \mathbf{u}}{\partial \tau} = \mathbf{J} \eta \mathbf{u} + \mathbf{D} \nabla_\xi^2 \eta \mathbf{u}, \quad (2.18)$$

dove $\mathbf{D} = \text{diag}(\mu, 1, \psi)$ raccoglie i coefficienti di diffusione adimensionali e $\mathbf{J}$ è la matrice Jacobiana del termine reattivo valutata nell'equilibrio (c^*, n^*, h^*) :

$$\begin{aligned} \mathbf{J} &= \begin{pmatrix} J_{11} & J_{12} & J_{13} \\ J_{21} & J_{22} & J_{23} \\ J_{31} & J_{32} & J_{33} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \partial_c f_c & \partial_n f_c & \partial_h f_c \\ \partial_c f_n & \partial_n f_n & \partial_h f_n \\ \partial_c f_h & \partial_n f_h & \partial_h f_h \end{pmatrix} = \\ &= \begin{pmatrix} 2\gamma_t c^* n^* - (\alpha_t + \beta_t h^*) & \gamma_t c^{*2} & -\beta_t c^* \\ -2\gamma_t c^* n^* & -\gamma_t c^{*2} - \lambda & 0 \\ \alpha_t + \beta_t h^* & 0 & \beta_t c^* - 1 \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (2.19)$$

Per arrivare alla relazione 2.21, poiché la 2.18 è lineare, si considera una soluzione in forma di onde piane [7, par. 2.3]:

$$\eta \mathbf{u}(\boldsymbol{\xi}, \tau) = \boldsymbol{\varepsilon} e^{\Lambda \tau + i \boldsymbol{\sigma} \cdot \boldsymbol{\xi}}, \quad (2.20)$$

in cui $\boldsymbol{\varepsilon} \in \mathbb{R}^3$ è il vettore delle ampiezze, $\boldsymbol{\sigma}$ il vettore d'onda e Λ il corrispondente tasso di crescita temporale.

Sostituendo la definizione (2.20) nella relazione (2.18) e sfruttando l'identità $\nabla_\xi^2 e^{i \boldsymbol{\sigma} \cdot \boldsymbol{\xi}} = -\sigma^2 e^{i \boldsymbol{\sigma} \cdot \boldsymbol{\xi}}$ [30, par. 3.3], con $\sigma = |\boldsymbol{\sigma}|$ numero d'onda, si giunge al problema agli autovalori [7, 30]:

$$\mathbf{S}(\sigma^2) \boldsymbol{\varepsilon} = \Lambda \boldsymbol{\varepsilon}, \quad \mathbf{S}(\sigma^2) = \mathbf{J} - \sigma^2 \mathbf{D}. \quad (2.21)$$

La matrice $\mathbf{S}(\sigma^2)$, detta matrice delle perturbazioni spaziali, governa la dinamica lineare della perturbazione tramite i suoi autovalori $\Lambda(\sigma^2)$ [7, par. 2.3]: la perturbazione decade se $\Re(\Lambda) < 0$ per tutti e tre gli autovalori, mentre cresce esponenzialmente non appena almeno uno di essi soddisfa $\Re(\Lambda) > 0$.

Ora, per indagare la stabilità del sistema omogeneo, si cercano le soluzioni del polinomio caratteristico $|\mathbf{J} - \Lambda \mathbf{I}| = 0$, che produrrà l'equazione cubica per gli autovalori Λ :

$$\Lambda^3 + \mathcal{A} \Lambda^2 + \mathcal{B} \Lambda + \mathcal{C} = 0 \quad (2.22)$$

Dove i coefficienti del polinomio sono:

$$\mathcal{A} = -\text{tr}(\mathbf{J}) \quad (2.23a)$$

$$\mathcal{B} = \det \begin{pmatrix} J_{22} & 0 \\ 0 & J_{33} \end{pmatrix} + \det \begin{pmatrix} J_{11} & J_{13} \\ J_{31} & J_{33} \end{pmatrix} + \det \begin{pmatrix} J_{11} & J_{12} \\ J_{21} & J_{22} \end{pmatrix} \quad (2.23b)$$

$$\mathcal{C} = -\det(\mathbf{J}) \quad (2.23c)$$

Secondo i criteri di Routh-Hurwitz per un polinomio cubico [5, p. 508], affinché il sistema generi delle instabilità deve accadere che lo stato omogeneo sia stabile ($\Re(\Lambda) < 0$) e i coefficienti debbano soddisfare le seguenti condizioni:

$$\mathcal{A} = -\text{tr}(\mathbf{J}) > 0 \quad (2.24a)$$

$$\mathcal{C} = -\det(\mathbf{J}) > 0 \quad (2.24b)$$

$$\mathcal{AB} - \mathcal{C} > 0 \quad (2.24c)$$

Se il sistema di equazioni differenziali soddisfa le condizioni di stabilità in assenza di diffusione 2.24, è possibile procedere verso l'indagine dell'instabilità del sistema omogeneo con la matrice delle perturbazioni spaziali (2.21), $\mathbf{S} = \mathbf{J} - \sigma^2 \mathbf{D}$:

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} 2\gamma_t c^* n^* - (\alpha_t + \beta_t h^*) - \mu \sigma^2 & \gamma_t c^{*2} & -\beta_t c^* \\ -2\gamma_t c^* n^* & -\gamma_t c^{*2} - \lambda - \sigma^2 & 0 \\ \alpha_t + \beta_t h^* & 0 & \beta_t c^* - 1 - \psi \sigma^2 \end{pmatrix} \quad (2.25)$$

Affinché il sistema generi dei *pattern* spaziali, la diffusione deve destabilizzare lo stato stazionario, che in assenza di essa era stabile. Questo significa che almeno un autovalore spaziale $\Lambda(\sigma^2)$ deve avere una parte reale positiva ($\Re(\Lambda) > 0$). I coefficienti del polinomio caratteristico ora dipendono dal quadrato del numero d'onda e la 2.22 diviene:

$$\Lambda^3 + \mathcal{A}(\sigma^2)\Lambda^2 + \mathcal{B}(\sigma^2)\Lambda + \mathcal{C}(\sigma^2) = 0 \quad (2.26)$$

Applicando nuovamente i criteri di Routh-Hurwitz al polinomio caratteristico dipendente da σ^2 (2.26), si ha:

$$\mathcal{A}(\sigma^2) = -\text{tr}(\mathbf{S}) > 0 \quad (2.27a)$$

$$\mathcal{C}(\sigma^2) = -\det(\mathbf{S}) > 0 \quad (2.27b)$$

$$\mathcal{A}(\sigma^2)\mathcal{B}(\sigma^2) - \mathcal{C}(\sigma^2) > 0 \quad (2.27c)$$

L'instabilità di Turing si verifica se e solo se esiste un numero d'onda σ per cui almeno una delle condizioni di stabilità (2.27) risulta violata, mentre rimangono tutte soddisfatte in assenza della diffusione (2.22). Ovvero, si cerca quell'intervallo in cui σ^2 rende falsa una delle 2.27; solitamente, la 2.27b.

Operativamente, anziché verificare per via numerica la violazione delle disuguaglianze (2.27) sui coefficienti $\mathcal{A}(\sigma^2)$, $\mathcal{B}(\sigma^2)$, $\mathcal{C}(\sigma^2)$, si calcolano direttamente gli autovalori di $\mathbf{S}(\sigma^2)$ controllando il segno della loro parte reale: i due approcci sono equivalenti per il polinomio cubico (2.26), in quanto le radici di quest'ultimo coincidono per costruzione con gli autovalori $\Lambda(\sigma^2)$, e il calcolo diretto è numericamente più stabile, oltre a essere meno esposto a falsi positivi nella diagnosi dell'instabilità.

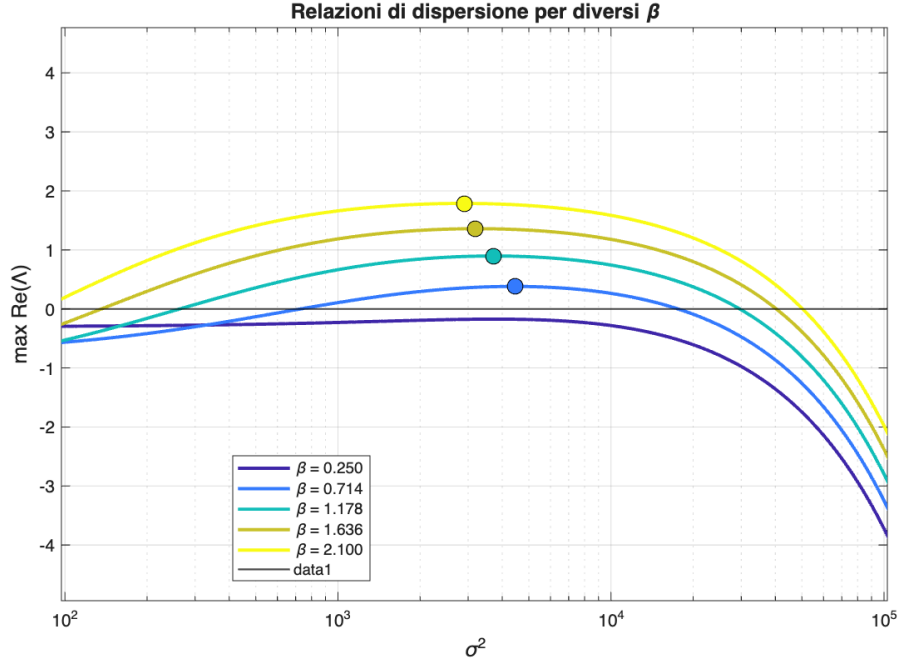


Figura 2.1: Grafico di dispersione del modello (2.5) e parametri di Tabella 3.2.

La verifica analitica delle disuguaglianze (2.24) e (2.27) per il sistema in esame è proibitiva: i coefficienti $\mathcal{A}(\sigma^2)$, $\mathcal{B}(\sigma^2)$ e $\mathcal{C}(\sigma^2)$ sono espressioni razionali nei parametri adimensionali $(\gamma_t, \alpha, \beta, \lambda, \mu, \psi)$ valutate nei punti di equilibrio (c^*, n^*, h^*) , anch'essi funzioni implicite degli stessi parametri. L'analisi prosegue, dunque, per via numerica, su *set* di parametri ricavati dalla letteratura.

Si è scritto un breve codice in MATLAB che, fissato il *set* di parametri adimensionali $(\gamma_t, \alpha, \beta, \lambda, \mu, \psi)$, ha eseguito in sequenza le operazioni richieste dall'analisi di stabilità lineare. Si procede calcolando i tre equilibri omogenei, risolvendo il sistema (2.9) e scartando quelli non fisicamente accettabili, ovvero per cui valgono $c^* \geq 0$, $n^* > 0$, $h^* \geq 0$ e $1 - \beta_t c^* > 0$. La costruzione della matrice $\mathbf{S}(\sigma^2)$ e lo scan in σ^2 vengono condotti sul ramo superiore c_2^* (di seguito denominato *upper*), in quanto il ramo inferiore c_3^* (*lower*) risulta instabile a $\sigma^2 = 0$ per tutti i *set* di parametri considerati e non può, quindi, supportare un'instabilità di Turing, che per definizione richiede stabilità dello stato omogeneo in assenza di diffusione. Per il ramo *upper* si calcolano gli autovalori di $\mathbf{S}(\sigma^2)$ su una griglia logaritmica $\sigma^2 \in [10^{-2}, 10^6]$ di 600 punti. Selezionando per ogni σ^2 l'autovalore con parte reale massima si ottiene la relazione di dispersione $\Lambda_{\max}(\sigma^2)$, dalla quale si identifica l'eventuale finestra di Turing in cui $\Lambda_{\max} > 0$ (vedi Figura 2.1. L'estremo superiore della griglia, $\sigma_{\max}^2 = 10^6$, è stato scelto sufficientemente grande da garantire $\Lambda_{\max}(\sigma_{\max}^2) < 0$ per tutti i casi esplorati, assicurando di catturare l'intera finestra instabile.

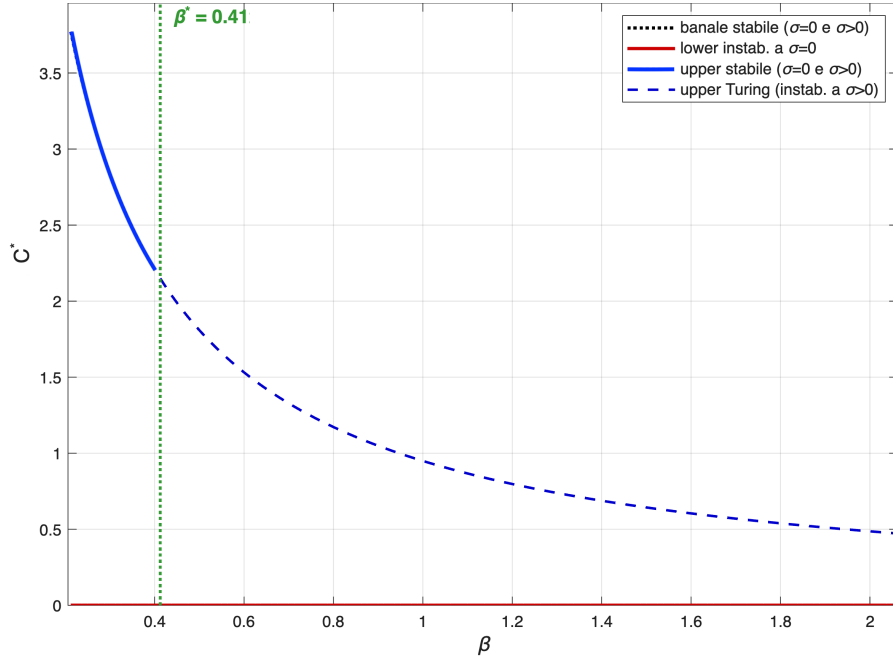


Figura 2.2: Diagramma di biforcazione del modello (2.5) e parametri di Tabella 3.2.

Per condurre l'esplorazione numerica si è impiegato il *set* di parametri adimensionali riportato in Tabella 3.2, calibrato in modo da collocare il sistema nella regione di instabilità di Turing dello spazio dei parametri. La derivazione di tale *set* a partire dai valori dimensionali tratti dalla letteratura, insieme alla discussione della procedura di calibrazione e alla giustificazione delle scelte numeriche, è rimandata alla Sezione 3.2. L'esplorazione è stata condotta sul range $\gamma_t \in [5, 400]$ e $\beta_t \in [0.4, 1.0]$, ottenuto da tale procedura di calibrazione; per i parametri di Tabella 3.2 l'instabilità di Turing emerge a partire da $\beta_t \gtrsim 0.41$ (vedi Figura 2.2, mentre la dipendenza dei *pattern* da γ_t nel range esplorato è discussa in Sezione 3.3.

2.4 Modello a due popolazioni cellulari: Sane vs Tumoriali

Come già fatto per il modello precedente, il sistema fisico di quattro equazioni 2.4 è stato adimensionalizzato nel seguente modello:

$$\begin{cases} \frac{\partial c_h}{\partial \tau} = \mu \nabla_{\xi}^2 c_h + \Theta(\zeta) c_h^{\zeta} n - \omega c_h - (\alpha_h + \beta_h h) c_h - \nu c_h c_t \\ \frac{\partial c_t}{\partial \tau} = \mu \nabla_{\xi}^2 c_t + \Gamma(\varphi) c_t^{\varphi} n + \omega \kappa c_h - (\alpha_t + \beta_t h) c_t \\ \frac{\partial n}{\partial \tau} = \nabla_{\xi}^2 n + 1 - \Theta(\zeta) c_h^{\zeta} n - \Gamma(\varphi) c_t^{\varphi} n - \lambda n \\ \frac{\partial h}{\partial \tau} = \psi \nabla_{\xi}^2 h + \alpha_t c_t - (1 - \beta_t c_t) h \end{cases} \quad (2.28)$$

Nella sezione successiva 2.4.1, si approfondisce la derivazione matematica del modello adimensionale 2.28 appena esposto. In Tabella 2.2, si anticipano la definizione dei parametri e la loro relativa funzione biologica.

2.4.1 Sistema Adimensionalizzato

Per rendere adimensionale il sistema 2.4 e identificare i parametri dominanti, si introducono le seguenti variabili adimensionali:

$$c_h = \frac{K r_H}{\gamma_H \delta_v} C_H, \quad c_t = \frac{K r_T}{\gamma_T \delta_v} C_T, \quad n = \frac{K}{\delta_v} N, \quad h = \frac{K r_T}{\gamma_T \delta_v q} H,$$

$$\tau = K t, \quad \xi = \mathbf{x} \sqrt{\frac{K}{D_N}},$$

dove $K = (k + w \delta_v)$ è il tasso di *clearance* totale dell'acido. Partendo dall'equazione dimensionale per le cellule sane:

$$\frac{\partial C_H}{\partial t} = D_C \nabla^2 C_H + \gamma_H C_H^{\zeta} N - \varepsilon_{HT} C_H - (d_H + s_H H) C_H - \chi C_H C_T$$

Sostituendo opportunamente con le definizioni sopra esposte:

$$\begin{aligned} \frac{\gamma_H \delta_v}{r_H} \frac{\partial c_h}{\partial \tau} &= \frac{D_C}{D_N} K \frac{\gamma_H \delta_v}{K r_H} \nabla_{\xi}^2 c_h + \gamma_H \frac{\gamma_H^{\zeta} \delta_v^{\zeta}}{K^{\zeta} r_H^{\zeta}} c_h^{\zeta} \frac{\delta_v}{K} n + \\ &\quad - \varepsilon_{HT} \frac{\gamma_H \delta_v}{K r_H} c_h - \left(d_H + \frac{s_H \gamma_T \delta_v q}{K r_T} h \right) \frac{\gamma_H \delta_v}{K r_H} c_h - \chi \frac{\gamma_H \delta_v}{K r_H} c_h \frac{\gamma_T \delta_v}{K r_T} c_t \end{aligned}$$

Tabella 2.2: Parametri adimensionali del modello a due specie cellulari.

Parametro	Definizione	Significato Biologico
μ	D_C/D_N	Rapporto di diffusione per le cellule.
ψ	D_H/D_N	Rapporto di diffusione per gli ioni H^+ .
$\Theta(\zeta)$	$\frac{\gamma_H^\zeta \delta_v^\zeta}{K^{\zeta+1} r_H^{\zeta-1}}$	Proliferazione delle cellule sane.
$\Gamma(\varphi)$	$\frac{\gamma_T^\varphi \delta_v^\varphi}{K^{\varphi+1} r_T^{\varphi-1}}$	Proliferazione delle cellule tumorali.
ω	$\frac{\varepsilon_{HT}}{K}$	Tasso di mutazione/transizione da fenotipo sano a tumorale.
α_h	$\frac{d_H}{K}$	Morte naturale (apoptosi) per le cellule sane.
α_t	$\frac{d_T}{K}$	Morte naturale (apoptosi) per le cellule tumorali.
β_h	$\frac{s_H \gamma_T \delta_v q}{K^2 r_T}$	Sensibilità al pH acido delle cellule sane.
β_t	$\frac{s_T \gamma_T \delta_v q}{K^2 r_T}$	Sensibilità al pH acido delle cellule tumorali.
κ	$\frac{\gamma_H r_T}{\gamma_T r_H}$	Rapporto di efficienza metabolica.
ν	$\chi \frac{\gamma_T \delta_v}{K^2 r_T}$	Indice di competizione.
λ	$\frac{\delta}{K}$	Apporto vascolare dei nutrienti.

Operando le dovute semplificazioni:

$$\frac{\partial c_h}{\partial \tau} = \frac{D_C}{D_N} \nabla_\xi^2 c_h + \frac{\gamma_H^\zeta \delta_v^\zeta}{K^{\zeta+1} r_H^{\zeta-1}} c_h^\zeta n - \frac{\varepsilon_{HT}}{K} c_h - \left(\frac{d_H}{K} + s_H \frac{\gamma_T \delta_v q}{K^2 r_T} h \right) c_h - \chi \frac{\gamma_T \delta_v}{K^2 r_T} c_h c_t$$

Ed identificando i parametri adimensionali corretti, si ottiene:

$$\frac{\partial c_h}{\partial \tau} = \mu \nabla_\xi^2 c_h + \Theta(\zeta) c_h^\zeta n - \omega c_h - (\alpha_h + \beta_h h) c_h - \nu c_h c_t \quad (2.29)$$

Si considera ora l'equazione dimensionale per le cellule tumorali:

$$\frac{\partial C_T}{\partial t} = D_C \nabla^2 C_T + \gamma_T C_T^\varphi N + \varepsilon_{HT} C_H - (d_T + s_T H) C_T$$

Sostituendo opportunamente con le definizioni sopra esposte:

$$\begin{aligned} \frac{\gamma_T \delta_v}{r_T} \frac{\partial c_t}{\partial \tau} &= \frac{D_C}{D_N} \frac{\gamma_T \delta_v}{r_T} \nabla_\xi^2 c_t + \gamma_T \delta_v \frac{\gamma_T^\varphi \delta_v^\varphi}{K^{\varphi+1} r_T^\varphi} c_t^\varphi n + \\ &+ \varepsilon_{HT} \frac{\gamma_H \delta_v}{K r_H} c_h - \left(d_T + s_T \frac{\gamma_T \delta_v q}{K r_T} h \right) \frac{\gamma_T \delta_v}{K r_T} c_t \end{aligned}$$

Svolgendo le dovute semplificazioni:

$$\frac{\partial c_t}{\partial \tau} = \frac{D_C}{D_N} \nabla_\xi^2 c_t + \frac{\gamma_T^\varphi \delta_v^\varphi}{K^{\varphi+1} r_T^{\varphi-1}} c_t^\varphi n + \frac{\varepsilon_{HT} \gamma_H r_T}{K \gamma_T r_H} c_h - \left(\frac{d_T}{K} + \frac{s_T \gamma_T \delta_v q}{K^2 r_T} h \right) c_t$$

Identificando gli stessi parametri del modello precedente e rinominandoli:

$$\frac{\partial c_t}{\partial \tau} = \mu \nabla_\xi^2 c_t + \Gamma(\varphi) c_t^\varphi n + \omega \kappa c_h - (\alpha_t + \beta_t h) c_t \quad (2.30)$$

Per l'equazione dimensionale dei nutrienti:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \delta_v - r_H C_H^\zeta N - r_T C_T^\varphi N - \delta N$$

Sostituendo opportunamente con le definizioni sopra esposte:

$$\frac{\partial n}{\partial \tau} = \nabla_\xi^2 n + 1 - \frac{\gamma_H^\zeta \delta_v^\zeta}{K^{\zeta+1} r_H^{\zeta-1}} c_h^\zeta n - \frac{\gamma_T^\varphi \delta_v^\varphi}{K^{\varphi+1} r_T^{\varphi-1}} c_t^\varphi n - \frac{\delta}{K} n$$

Identificando i parametri adimensionali:

$$\frac{\partial n}{\partial \tau} = \nabla_\xi^2 n + 1 - \Theta(\zeta) c_h^\zeta n - \Gamma(\varphi) c_t^\varphi n - \lambda n \quad (2.31)$$

L'equazione che descrive la diffusione è rimasta invariata, dunque si riscrive la 2.8:

$$\frac{\partial h}{\partial \tau} = \psi \nabla_\xi^2 h + \alpha_t c_t - (1 - \beta_t c_t) h$$

2.4.2 Analisi di Stabilità Lineare

L'analisi di stabilità del modello (2.28) procede secondo lo schema già adottato in Sezione 2.3.2 per il modello (2.5), adattato al sistema a quattro componenti. Rispetto al caso a singola popolazione, la presenza del termine di morte per contatto

($-\nu c_h c_t$ in f_{c_h}) accoppia direttamente le due popolazioni cellulari nel transitorio, modificando le scale temporali della destabilizzazione del fronte d'invasione. Siano (c_h^*, c_t^*, n^*, h^*) le soluzioni costanti nello spazio e nel tempo, ricavate annullando i termini reattivi del sistema (2.28):

$$f_{c_h} = \Theta(\zeta)c_h^\zeta n - \omega c_h - (\alpha_h + \beta_h h)c_h - \nu c_h c_t = 0 \quad (2.32a)$$

$$f_{c_t} = \Gamma(\varphi)c_t^\varphi n + \omega \kappa c_h - (\alpha_t + \beta_t h)c_t = 0 \quad (2.32b)$$

$$f_n = 1 - \Theta(\zeta)c_h^\zeta n - \Gamma(\varphi)c_t^\varphi n - \lambda n = 0 \quad (2.32c)$$

$$f_h = \alpha_t c_t - (1 - \beta_t c_t)h = 0 \quad (2.32d)$$

Dalle equazioni $f_n = 0$ ed $f_h = 0$ si esplicitano:

$$n^* = \frac{1}{\Theta(\zeta)c_h^{\zeta*} + \Gamma(\varphi)c_t^{\varphi*} + \lambda}, \quad h^* = \frac{\alpha_t c_t^*}{1 - \beta_t c_t^*}$$

dove, quest'ultima è soggetta al vincolo $1 - \beta_t c_t^* > 0$. La sostituzione di n^* ed h^* in $f_{c_h} = 0$ ed $f_{c_t} = 0$ riduce il problema ad un sistema implicito nelle due incognite (c_h^*, c_t^*) che, contrariamente al caso precedente, non ammette in generale soluzioni in forma chiusa, sia per l'accoppiamento dovuto al termine di transizione ($\omega \kappa c_h$), sia per quello dovuto al termine di morte per contatto ($-\nu c_h c_t$). Si individuano, tuttavia, alcuni casi notevoli: l'equilibrio banale ($c_h^* = c_t^* = 0$) da cui si ricavano $n^* = 1/\lambda$ ed $h^* = 0$; una eventuale configurazione di sole cellule sane ($c_h^* > 0, c_t^* = 0$), che con $\omega > 0$ non è un equilibrio ammissibile poiché $f_{c_t} = \omega \kappa c_h \neq 0$, ma è recuperabile solo nel limite degenerare $\omega \rightarrow 0$; l'equilibrio di sole cellule tumorali ($c_h^* = 0, c_t^* > 0$), dove, annullandosi sia il termine di transizione $\omega \kappa c_h$ sia quello di competizione $\nu c_h c_t$, si recuperano esattamente i tre equilibri del modello a singola popolazione (2.5); ed, infine, un'eventuale configurazione di coesistenza ($c_h^*, c_t^* > 0$). L'esplorazione numerica del *set* di parametri considerato in questo lavoro non ha individuato un equilibrio di coesistenza fisicamente accettabile e stabile a $\sigma^2 = 0$: il termine di transizione fenotipica $\omega \kappa c_h$, anche se piccolo, alimenta continuamente la popolazione tumorale a partire da quella sana, mentre il termine di morte per contatto $-\nu c_h c_t$ e l'assenza di rigenerazione del tessuto sano impediscono che le cellule c_h si autosostengano. Coerentemente, le simulazioni numeriche del Capitolo 3 mostrano che la dinamica converge asintoticamente all'equilibrio di sole cellule tumorali. L'analisi di stabilità lineare per via numerica si concentra dunque su quest'ultimo, che con $\omega > 0$ resta un equilibrio ammissibile, poiché $f_{c_t} = \omega \kappa c_h = 0$ quando $c_h = 0$.

Come fatto per il modello a tre variabili dipendenti, stabiliti gli equilibri

omogenei, se ne studia ora la stabilità rispetto a piccole perturbazioni. Si pone:

$$\begin{pmatrix} c_h(\boldsymbol{\xi}, \tau) \\ c_t(\boldsymbol{\xi}, \tau) \\ n(\boldsymbol{\xi}, \tau) \\ h(\boldsymbol{\xi}, \tau) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} c_h^* \\ c_t^* \\ n^* \\ h^* \end{pmatrix} + \eta \mathbf{u}(\boldsymbol{\xi}, \tau), \quad \|\eta \mathbf{u}\| \ll 1, \quad (2.33)$$

con $\eta \mathbf{u} = (\eta c_h, \eta c_t, \eta n, \eta h)^\top$. Sostituendo (2.33) nel sistema (2.28) e trattenendo i soli termini al primo ordine in $\eta \mathbf{u}$, si ottiene il sistema linearizzato [7, par. 2.3]:

$$\frac{\partial \eta \mathbf{u}}{\partial \tau} = \mathbf{J} \eta \mathbf{u} + \mathbf{D} \nabla_\xi^2 \eta \mathbf{u}, \quad (2.34)$$

dove $\mathbf{D} = \text{diag}(\mu, \mu, 1, \psi)$ è la matrice dei coefficienti di diffusione adimensionali e $\mathbf{J} \in \mathbb{R}^{4 \times 4}$ è la matrice Jacobiana del termine reattivo valutata nell'equilibrio:

$$\mathbf{J} = \begin{pmatrix} \partial_{c_h} f_{c_h} & \partial_{c_t} f_{c_h} & \partial_n f_{c_h} & \partial_h f_{c_h} \\ \partial_{c_h} f_{c_t} & \partial_{c_t} f_{c_t} & \partial_n f_{c_t} & \partial_h f_{c_t} \\ \partial_{c_h} f_n & \partial_{c_t} f_n & \partial_n f_n & \partial_h f_n \\ \partial_{c_h} f_h & \partial_{c_t} f_h & \partial_n f_h & \partial_h f_h \end{pmatrix}$$

Scritta per componenti, si hanno:

$$J_{11} = \zeta \Theta(\zeta) c_h^{*\zeta-1} n^* - \omega - (\alpha_h + \beta_h h^*) - \nu c_t^* \quad (2.35a)$$

$$J_{12} = -\nu c_h^* \quad (2.35b)$$

$$J_{13} = \Theta(\zeta) c_h^{*\zeta} \quad (2.35c)$$

$$J_{14} = -\beta_h c_h^* \quad (2.35d)$$

$$J_{21} = \omega \kappa \quad (2.35e)$$

$$J_{22} = \varphi \Gamma(\varphi) c_t^{*\varphi-1} n^* - (\alpha_t + \beta_t h^*) \quad (2.35f)$$

$$J_{23} = \Gamma(\varphi) c_t^{*\varphi} \quad (2.35g)$$

$$J_{24} = -\beta_t c_t^* \quad (2.35h)$$

$$J_{31} = -\zeta \Theta(\zeta) c_h^{*\zeta-1} n^* \quad (2.35i)$$

$$J_{32} = -\varphi \Gamma(\varphi) c_t^{*\varphi-1} n^* \quad (2.35j)$$

$$J_{33} = -\Theta(\zeta) c_h^{*\zeta} - \Gamma(\varphi) c_t^{*\varphi} - \lambda \quad (2.35k)$$

$$J_{34} = 0 \quad (2.35l)$$

$$J_{41} = 0 \quad (2.35m)$$

$$J_{42} = \alpha_t + \beta_t h^* \quad (2.35n)$$

$$J_{43} = 0 \quad (2.35o)$$

$$J_{44} = \beta_t c_t^* - 1 \quad (2.35p)$$

$$(2.35q)$$

La presenza del termine di competizione $-\nu c_h c_t$ in f_{c_h} si traduce in due contributi nella Jacobiana: una correzione $-\nu c_t^*$ all'elemento diagonale J_{11} , che agisce come tasso di morte effettivo proporzionale alla densità tumorale d'equilibrio, e un nuovo elemento extra-diagonale $J_{12} = -\nu c_h^*$, che accoppia direttamente la perturbazione della popolazione sana a quella tumorale e che era nullo nel modello senza competizione.

Per arrivare al problema agli autovalori, poiché la (2.34) è lineare, si considera una soluzione in forma di onde piane [7, par. 2.3]:

$$\eta \mathbf{u}(\boldsymbol{\xi}, \tau) = \boldsymbol{\varepsilon} e^{\Lambda \tau + i \boldsymbol{\sigma} \cdot \boldsymbol{\xi}}, \quad (2.36)$$

in cui $\boldsymbol{\varepsilon} \in \mathbb{R}^4$ è il vettore delle ampiezze, $\boldsymbol{\sigma}$ il vettore d'onda e Λ il corrispondente tasso di crescita temporale. Sostituendo (2.36) nella (2.34) e sfruttando l'identità $\nabla_{\boldsymbol{\xi}}^2 e^{i \boldsymbol{\sigma} \cdot \boldsymbol{\xi}} = -\sigma^2 e^{i \boldsymbol{\sigma} \cdot \boldsymbol{\xi}}$ [30, par. 3.3], con $\sigma = |\boldsymbol{\sigma}|$ numero d'onda, si perviene al problema agli autovalori:

$$\mathbf{S}(\sigma^2) \boldsymbol{\varepsilon} = \Lambda \boldsymbol{\varepsilon}, \quad \mathbf{S}(\sigma^2) = \mathbf{J} - \sigma^2 \mathbf{D}. \quad (2.37)$$

La perturbazione decade se $\Re(\Lambda) < 0$ per tutti e quattro gli autovalori di $\mathbf{S}(\sigma^2)$, mentre cresce esponenzialmente non appena almeno uno di essi soddisfa $\Re(\Lambda) > 0$ [7, par. 2.3].

Per indagare la stabilità del sistema omogeneo si cercano le soluzioni del polinomio caratteristico $|\mathbf{J} - \Lambda \mathbf{I}| = 0$, che, vista la dimensione della Jacobiana, produce un'equazione di quarto grado per gli autovalori Λ :

$$\Lambda^4 + \mathcal{A} \Lambda^3 + \mathcal{B} \Lambda^2 + \mathcal{C} \Lambda + \mathcal{D} = 0 \quad (2.38)$$

i cui coefficienti dipendono dalle invarianti della Jacobiana,

$$\mathcal{A} = -\text{tr}(\mathbf{J}) \quad (2.39a)$$

$$\mathcal{B} = \sum_{1 \leq i < j \leq 4} \det \begin{pmatrix} J_{ii} & J_{ij} \\ J_{ji} & J_{jj} \end{pmatrix} \quad (2.39b)$$

$$\mathcal{C} = - \sum_{1 \leq i < j < k \leq 4} \det \begin{pmatrix} J_{ii} & J_{ij} & J_{ik} \\ J_{ji} & J_{jj} & J_{jk} \\ J_{ki} & J_{kj} & J_{kk} \end{pmatrix} \quad (2.39c)$$

$$\mathcal{D} = \det(\mathbf{J}) \quad (2.39d)$$

dove, $\mathcal{B}$ è la somma dei minori principali di ordine due e $\mathcal{C}$ è meno la somma dei minori principali di ordine tre [5, p. 508].

Secondo i criteri di Routh–Hurwitz applicati a (2.38), l'equilibrio omogeneo è stabile ($\Re(\Lambda) < 0$) in assenza di diffusione se e solo se i coefficienti soddisfano

simultaneamente le seguenti disuguaglianze [5, p. 508]:

$$\mathcal{A} > 0 \quad (2.40a)$$

$$\mathcal{C} > 0 \quad (2.40b)$$

$$\mathcal{D} > 0 \quad (2.40c)$$

$$\mathcal{A}\mathcal{B}\mathcal{C} - \mathcal{C}^2 - \mathcal{A}^2\mathcal{D} > 0 \quad (2.40d)$$

Se il sistema di equazioni differenziali soddisfa le condizioni di stabilità in assenza di diffusione (2.40), è possibile procedere verso l'indagine dell'instabilità del sistema omogeneo con la matrice delle perturbazioni spaziali $\mathbf{S}$ (2.37). Affinché il sistema generi dei *pattern* spaziali, la diffusione deve destabilizzare lo stato stazionario, che in assenza di essa era stabile. Questo significa che almeno un autovalore spaziale $\Lambda(\sigma^2)$ deve avere parte reale positiva ($\Re(\Lambda) > 0$). I coefficienti del polinomio caratteristico diventano funzioni di σ^2 e la (2.38) si riscrive come:

$$\Lambda^4 + \mathcal{A}(\sigma^2)\Lambda^3 + \mathcal{B}(\sigma^2)\Lambda^2 + \mathcal{C}(\sigma^2)\Lambda + \mathcal{D}(\sigma^2) = 0 \quad (2.41)$$

Applicando nuovamente i criteri di Routh–Hurwitz al polinomio caratteristico dipendente da σ^2 (2.41), si ha:

$$\mathcal{A}(\sigma^2) = -\text{tr}(\mathbf{S}) > 0 \quad (2.42a)$$

$$\mathcal{C}(\sigma^2) > 0 \quad (2.42b)$$

$$\mathcal{D}(\sigma^2) = \det(\mathbf{S}) > 0 \quad (2.42c)$$

$$\mathcal{A}(\sigma^2)\mathcal{B}(\sigma^2)\mathcal{C}(\sigma^2) - \mathcal{C}(\sigma^2)^2 - \mathcal{A}(\sigma^2)^2\mathcal{D}(\sigma^2) > 0 \quad (2.42d)$$

L'instabilità di Turing si verifica se e solo se esiste un numero d'onda $\sigma^2 > 0$ tale per cui almeno una delle condizioni di stabilità (2.42) risulta violata, mentre rimangono tutte soddisfatte in assenza della diffusione (2.38). Ovvero, si cerca l'intervallo in cui σ^2 rende false una delle (2.42).

La verifica analitica delle disuguaglianze (2.40) e (2.42) per il sistema in esame è proibitiva: i coefficienti $\mathcal{A}(\sigma^2)$, $\mathcal{B}(\sigma^2)$, $\mathcal{C}(\sigma^2)$ e $\mathcal{D}(\sigma^2)$ sono espressioni razionali nei parametri adimensionali del modello (Θ , Γ , ω , α_h , α_t , β_h , β_t , λ , μ , ψ , ζ , φ), valutate negli equilibri non banali (c_h^* , c_t^* , n^* , h^*), anch'essi funzioni implicite degli stessi parametri. L'analisi prosegue, dunque, per via numerica, su *set* di parametri ricavati dalla letteratura.

Si è scritto un breve codice in MATLAB che, fissato il *set* di parametri adimensionali, ha eseguito in sequenza le operazioni richieste dall'analisi di stabilità lineare. Si procede calcolando per via numerica gli equilibri omogenei tramite risoluzione del sistema (2.32) e scartando quelli non fisicamente accettabili. Per ciascun equilibrio fisicamente ammissibile, ovvero l'equilibrio banale e l'equilibrio

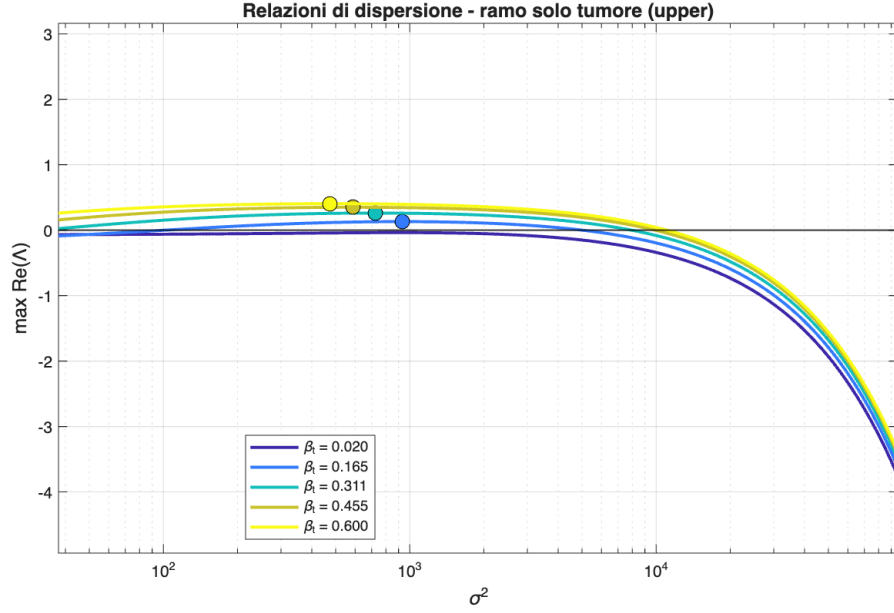


Figura 2.3: Grafico di dispersione del modello (2.28) con esponenti $\zeta = 1$ e $\varphi = 2$ e parametri di Tabella 3.4.

di sole cellule tumorali (ramo *upper*), si costruisce poi la matrice $\mathbf{S}(\sigma^2)$ e se ne calcolano gli autovalori come radici della quartica caratteristica (2.41) su una griglia logaritmica $\sigma^2 \in [10^{-2}, 10^6]$ di 600 punti. Selezionando per ogni σ^2 l'autovalore con parte reale massima si ottiene la relazione di dispersione $\Lambda_{\max}(\sigma^2)$, dalla quale si identifica la finestra di Turing in cui $\Lambda_{\max} > 0$ (vedi Figura 2.3). L'instabilità e la formazione di *pattern* si verificano per $5 \leq \Gamma \leq 200$ e $\beta_t \geq 0.17$.

Per condurre l'esplorazione numerica si è impiegato il *set* di parametri adimensionali riportato in Tabella 3.4, calibrato in modo da collocare il sistema nella regione di instabilità di Turing dello spazio dei parametri. In Figura 2.4 si mostra il diagramma di biforcazione per le cellule tumorali al variare di β_t . In particolare, si evidenzia la soglia alla sensibilità ($\beta_t = 0.17$) per cui si ha l'insorgenza di *pattern*. La derivazione del *set* di parametri a partire dai valori dimensionali tratti dalla letteratura, insieme alla discussione della procedura di calibrazione e alla giustificazione delle scelte numeriche, è rimandata alla Sezione 3.2.

L'introduzione esplicita della popolazione sana c_h nel modello (2.28) non è quindi finalizzata a indagare un regime di coesistenza stazionaria fra i due fenotipi, che il sistema chiuso e privo di rigenerazione del tessuto sano non ammette, bensì a descrivere il transitorio di invasione di un tessuto sano da parte di un agglomerato tumorale localizzato. La competizione per le risorse e per lo spazio, durante il transitorio, modifica la dinamica di formazione del *pattern*, ne rallenta la

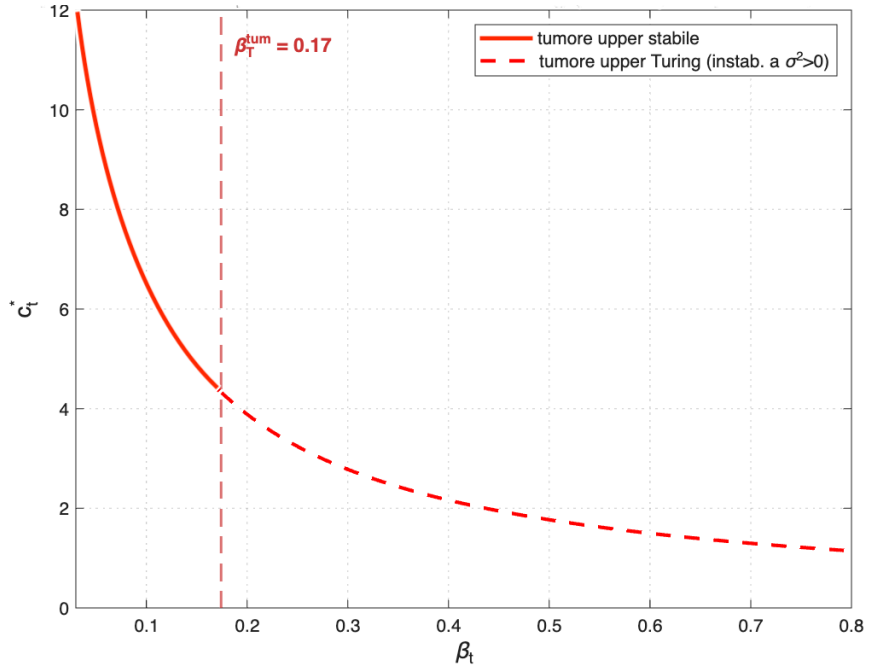


Figura 2.4: Diagramma di biforcazione del modello (2.28) con esponenti $\zeta = 1$ e $\varphi = 2$ e parametri di Tabella 3.4. Si nota che la soglia della sensibilità all'acidosi diminuisce al diminuire della proliferazione cellulare.

stabilizzazione e ne altera la morfologia intermedia, come si discuterà nel Capitolo 3. Asintoticamente il sistema converge all'equilibrio di sole cellule tumorali, ed è su tale equilibrio che si verifica l'insorgenza dell'instabilità di Turing.

Nel prossimo capitolo, si esporranno i dettagli dell'implementazione nel *software COMSOL Multiphysics*[®] e i risultati delle simulazioni numeriche dei modelli appena esposti.

Capitolo 3

Implementazione Numerica e Risultati

In questo capitolo si presentano i risultati numerici ottenuti dalla simulazione dei modelli di reazione–diffusione introdotti nel Capitolo 2. Le simulazioni sono state condotte in ambiente COMSOL Multiphysics[®], con l’obiettivo di osservare l’evoluzione spazio-temporale delle popolazioni cellulari e la formazione di *pattern* indotti dall’acidificazione del microambiente tumorale (*TME*).

Il capitolo è organizzato come segue. La Sezione 3.1 descrive l’implementazione numerica in COMSOL Multiphysics[®], dettagliando la geometria e la discretizzazione spaziale. La Sezione 3.2 documenta la scelta dei parametri biologici e la costruzione dei gruppi adimensionali che governano la dinamica. Le Sezioni 3.3 e 3.4 presentano e discutono i risultati delle simulazioni per il modello a singola popolazione e per il modello competitivo a due popolazioni, rispettivamente. Nella Sezione 3.5, si illustreranno alcuni confronti qualitativi dei risultati ottenuti dalle simulazioni con immagini istologiche reali di neoplasie. Infine, nella Sezione 3.6 si riassumono i risultati numerici discussi.

3.1 Implementazione in COMSOL Multiphysics[®]

Le equazioni adimensionali, 2.5 e 2.28, sono state risolte su un dominio quadrato bidimensionale $\Omega = [0, L] \times [0, L]$, definito nelle variabili adimensionali $\boldsymbol{\xi} = (\xi_x, \xi_y)$, introdotte nella sezione 2.3.1, come:

$$\Omega = \{(\xi_x, \xi_y) \in \mathbb{R}^2 : 0 \leq \xi_x \leq L, 0 \leq \xi_y \leq L, \text{ con } L = 1\} \quad (3.1)$$

dove, si ricorda che $\xi_i = i\sqrt{K/D_N}$ con $i = x, y$ e $L > 2\pi/\sigma_c$, con σ_c numero d’onda critico. Il lato del dominio è stato scelto pari all’unità come compromesso tra

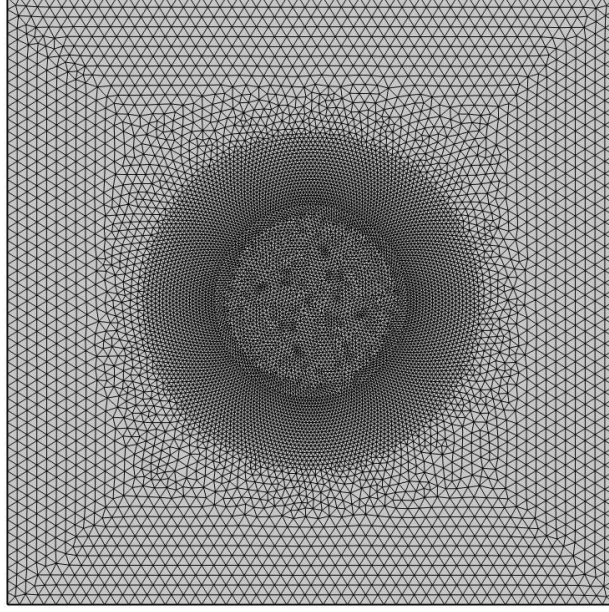


Figura 3.1: Griglia computazionale *ad hoc* adottata per la risoluzione della dinamica del modello (2.5).

il requisito di contenere un numero sufficiente di lunghezze d'onda del *pattern*, la riduzione degli effetti al bordo e il contenimento del costo computazionale. Il dominio Ω è stato partizionato con una griglia computazionale triangolare non strutturata se la condizione iniziale è un rumore casuale. Mentre, in Figura 3.1, si mostra la griglia utilizzata con la condizione iniziale di cellule concentrate nel dominio. Questa scelta rappresenta il migliore compromesso per catturare le dinamiche instabili discusse nella Sezione 3.3 e contenere il costo computazionale. Nelle simulazioni svolte una maggiore raffinazione della 3.1 non modifica i risultati ottenuti.

Su tutto il bordo $\partial\Omega$ sono state imposte le condizioni di flusso nullo (Neumann omogenee) sui quattro lati del dominio:

$$\mathbf{n} \cdot \nabla_{\xi} u_i = 0 \text{ su } \partial\Omega \quad (3.2)$$

dove $\mathbf{n}$ è il versore normale uscente e u_i sono le componenti del vettore $\mathbf{u}$ contenente le variabili dipendenti. Questa scelta corrisponde a un campione tissutale isolato senza scambi con il bordo, scelta standard per lo studio di *pattern* di Turing.

Le condizioni iniziali scelte variano in base al tipo di studio e si rendono esplicite nelle sezioni successive dedicate all'analisi quantitativa della dinamica dei modelli.

3.2 Scelta dei Parametri

In questa sezione, si identificano i valori biologici di riferimento nella letteratura scientifica, per poi derivare quantitativamente i gruppi adimensionali che governano le equazioni dei modelli trattati.

I lavori di Gatenby et al., dal 1996 [3], costituiscono un pilastro nella modellazione ed analisi del comportamento delle cellule tumorali, il quale è fortemente influenzato dal suo stesso metabolismo. I parametri biologici descritti in Tabella 1.1, nel Capitolo 1.4, rappresentano le fondamenta di questo lavoro di tesi per collegare la previsione numerica alla realtà fisiologica. Tuttavia, rispetto alla formulazione classica dei modelli di invasione tumorale e diffusione [7, Cap. 1], il modello 2.3 introduce una dipendenza quadratica della proliferazione e del consumo di nutrienti dalla densità cellulare ($\gamma_T C^2 N$, $r_T C^2 N$); tale modifica strutturale, ispirata al modello di vegetazione di Marasco et al. [18], comporta una rivisitazione dei valori numerici dei coefficienti corrispondenti, per garantire la consistenza dimensionale e una coerente collocazione del sistema nella regione di instabilità di Turing.

Più precisamente, i coefficienti γ_T e s_T non possono essere ripresi tal quali dalla letteratura, in quanto le rispettive unità di misura differiscono da quelle dei modelli logistici (a dipendenza lineare). Quindi, si è adottata una strategia diversa: i due gruppi adimensionali corrispondenti, γ_t e β_t , sono stati fissati a valori che collocano il sistema nella regione di instabilità di Turing identificata dall'analisi di stabilità lineare della Sezione 2.3.2; i valori dimensionali di γ_T e s_T sono stati quindi ricavati invertendo le definizioni dei rispettivi parametri adimensionali. Dunque, dalla definizione di γ_t in Tabella 2.1, si ottiene:

$$\gamma_T = \sqrt{\frac{\gamma_t K^3 r_T}{\delta_v^2}}, \quad (3.3)$$

mentre dalla definizione di β_t , una volta noto γ_T , si ricava:

$$s_T = \frac{\beta_t K^2 r_T}{\gamma_T \delta_v q}. \quad (3.4)$$

I parametri tratti direttamente dalla letteratura sono: i coefficienti di diffusione (D_C, D_N, D_H), il tasso di morte cellulare d_T ed il tasso di *washout* dei nutrienti δ . Alcuni parametri, invece, sono stati adattati dalla letteratura, come il tasso di consumo dei nutrienti r_T , la frazione di produzione acida q e il tasso di *clearance* dell'acido K , prendendo gli ordini di grandezza riportati in letteratura [3, 13, 19] e modulandoli in modo da risultare consistenti con i vincoli imposti dall'analisi di stabilità lineare. Questa procedura di calibrazione è motivata dalla scelta strutturale del modello di privilegiare il valore predittivo qualitativo (formazione, geometria e dipendenza parametrica dei *pattern*) rispetto

alla riproduzione quantitativa di un dataset specifico. Per cui si riconosce la limitatezza dei risultati ottenuti dal modello adimensionale nel collegamento alla biologia del fenomeno.

In Tabella 3.1, si riassumono i valori dei parametri appena descritti e la loro provenienza, ricordando che, dove necessario, i valori sono stati riportati alle unità di misura coerenti con la formulazione del modello 2.3.

Tabella 3.1: Valori dimensionali dei parametri del modello (2.5) e relative unità di misura.

Parametro	Valore	Unità	Fonte
D_C	2×10^{-10}	cm^2/s	Gatenby et al. [3]
D_N	5×10^{-6}	cm^2/s	Gatenby et al. [3]
D_H	1.08×10^{-5}	cm^2/s	Smallbone et al. [13]
γ_T	5.87×10^{-8} a 5.25×10^{-7}	$\text{cm}^3 \text{ cell}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Stimato per lo studio.
d_T	1×10^{-6}	s^{-1}	Gatenby et al. [3]
r_T	1×10^{-5}	$\text{cm}^6 \text{ cell}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Stimato per lo studio.
s_T	1.29×10^{-2} a 3.13×10^{-2}	$\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Stimato (<i>sweep</i> di β).
δ_v	1×10^{-2}	M s^{-1}	Stimato per lo studio.
δ	1.1×10^{-4}	s^{-1}	Gatenby et al. [3]
q	2.2×10^{-5}	mol cell^{-1}	Stimato per lo studio da Gatenby et al. [3].
K	1.902×10^{-5}	s^{-1}	Tasso totale di <i>clearance</i> dell'acido, $K = k + w \delta_v$.

In Tabella 3.2, si riportano i valori adimensionali calcolati come definito nella Sezione 2.3.1.

Tabella 3.2: Valori numerici dei parametri adimensionali del modello (2.5).

Parametro	Valore
μ	4×10^{-5}
ψ	2.16
γ_t	5 a 400
α_t	5.258×10^{-2}
β_t	0.41 a 1.0
λ	5.784

Riguardo al modello (2.28), si è scelto di indagare la dinamica di competizione per due *set* di esponenti: $(\zeta = 1, \varphi = 2)$ e $(\zeta = 1, \varphi = 5/4)$. Il primo per rimanere coerenti con il lavoro svolto nel modello (2.5). Il secondo per indagare uno scenario più vicino ai lavori di Perez et al. [24]. In Tabella 3.3, si riassumono i valori biologici di riferimento per il modello con $(\zeta = 1, \varphi = 2)$, dove γ_H e s_H sono stati ricavati come descritto per γ_T e s_T . Per il modello con $(\zeta = 1, \varphi = 5/4)$ si farà

Tabella 3.3: Valori dimensionali dei parametri del modello (2.28) con $(\zeta = 1, \varphi = 2)$ e relative unità di misura.

Parametro	Valore	Unità	Fonte
D_C	2×10^{-10}	cm^2/s	Gatenby et al. [3]
D_N	5×10^{-6}	cm^2/s	Gatenby et al. [3]
D_H	1.08×10^{-5}	cm^2/s	Smallbone et al. [13]
γ_H	1.81×10^{-6} e 1.81×10^{-7}	$1/(\text{Ms})$	Stimato per lo studio.
γ_T	1.85×10^{-7} e 1.03×10^{-7}	$\text{cm}^3 \text{ cell}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Stimato per lo studio.
d_H, d_T	1×10^{-6}	s^{-1}	Gatenby et al. [3]
r_H	1×10^{-5}	$\text{cm}^3 \text{ cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Stimato per lo studio.
r_T	1×10^{-5}	$\text{cm}^6 \text{ cell}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Stimato per lo studio.
s_H	3.39×10^{-2} a 1.99×10^{-1}	$\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Stimato (<i>sweep</i> di β_t).
s_T	2.71×10^{-2} a 1.59×10^{-1}	$\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Stimato (<i>sweep</i> di β_t).
χ	6.15×10^{-6}	$\text{cells}^{-1} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$	Stimato per lo studio.
ε_{HT}	1.902×10^{-8}	s^{-1}	Stimato per lo studio.
δ_v	1×10^{-2}	M s^{-1}	Stimato per lo studio.
δ	1.1×10^{-4}	s^{-1}	Gatenby et al. [3]
q	2.2×10^{-5}	$\text{M cm}^3 \text{ cell}^{-1}$	Stimato per lo studio da Gatenby et al. [3].
K	1.902×10^{-5}	s^{-1}	Tasso totale di <i>clearance</i> dell'acido, $K = k + w \delta_v$.

riferimento ai soli valori adimensionali presenti in Tabella 3.4.

Tabella 3.4: Stime dei Parametri adimensionali del modello a due specie cellulari (2.28).

Parametro	Valore
μ	4×10^{-5}
ψ	2.16
Θ	5 e 50
Γ	5 e 50
ω	1×10^{-3}
α_h	5.258×10^{-2}
α_t	5.258×10^{-2}
β_h	$5/4\beta_t$
β_t	0.17 a 1.0
ν	1×10^{-1}
κ	1.57 a 2.49
λ	5.784

3.3 Genesi di Pattern nel Modello a Singola Popolazione

Si discutono ora i risultati qualitativi prodotti dalle simulazioni del modello a singola popolazione (2.5). L'analisi è strutturata in due esplorazioni complementari. La prima fissa la proliferazione cellulare a $\gamma_t = 400$, valore rappresentativo di un fenotipo ad elevata aggressività, e studia la risposta del sistema al variare della sensibilità all'acidosi β_t , vero parametro di controllo della biforcazione di Turing identificata in Sezione 2.3.2. La seconda fissa β_t su due valori rappresentativi e varia γ_t per giustificare *a posteriori* la scelta del valore operativo e isolare il ruolo della proliferazione come acceleratore della dinamica.

La Figura 3.2 riporta i *pattern* formati dalle cellule tumorali c allo stato asintotico, $\tau = 250$, partendo da una condizione iniziale stocastica (3.5) e mantenendo fissi tutti i parametri della Tabella 3.2 ad eccezione della sensibilità all'acidosi β_t . Le condizioni iniziali, per ottenere i vari risultati di Figura 3.2, sono una perturbazione *random* della soluzione stazionaria per le cellule tumorali; spazialmente uniformi e pari all'unità per i nutrienti (tessuto ben ossigenato); nulle per gli ioni H^+ :

$$c_0(\mathbf{x}) = 0.5 + \text{rn1}(x, y) \quad (3.5a)$$

$$n_0(\mathbf{x}) = 1 \quad (3.5b)$$

$$h_0(\mathbf{x}) = 0 \quad (3.5c)$$

dove $\text{rn1}(x, y)$ è la funzione random di COMSOL Multiphysics®, che genera un rumore bianco spazialmente distribuito con distribuzione uniforme, media nulla e range unitario (valori in $[-0.5, 0.5]$). Sommato al valore base 0.5, il rumore

mantiene $c_0(\mathbf{x})$ nell'intervallo fisicamente ammissibile $[0,1]$, coerente con la concentrazione di nutrienti normalizzata. Tutti i sei pannelli si collocano sopra la soglia di Turing identificata in Sezione 2.3.2, $\beta_c \simeq 0.41$, esplorando regimi nonlineari progressivamente più lontani dalla biforcazione. Vicino alla soglia ($\beta_t = 0.41$ e $\beta_t = 0.45$) il *pattern* asintotico è di tipo labirintico: filamenti tortuosi e connessi, separati da regioni di bassa densità, con diametri irregolari e numerosi difetti reticolari. A $\beta_t = 0.50$ e $\beta_t = 0.60$ la rete inizia a frammentarsi e iniziano a comparire *spot* isolati a forma di goccia accanto ad alcuni filamenti residui. Per $\beta_t \geq 0.80$ il pattern asintotico è invece un reticolo di spot circolari isolati, con spaziatura quasi costante e pochi difetti residui. La spaziatura caratteristica fra i centri delle regioni ad alta densità rimane invece stabile. Quello che cambia con β_t non è, dunque, la scala del *pattern*, ma la sua morfologia: la transizione da filamenti a macchie riflette una selezione nonlineare guidata dall'intensità dell'instabilità e collega quantitativamente il valore del parametro biologico (sensibilità all'acidosi) al regime di organizzazione spaziale osservato.

Nelle Figure 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 si sono imposte le condizioni iniziali:

$$c_0(\mathbf{x}) = 0.1 \cdot \exp\left(-\frac{(x - L/2)^2 + (y - L/2)^2}{0.01}\right) \quad (3.6a)$$

$$n_0(\mathbf{x}) = 1 \quad (3.6b)$$

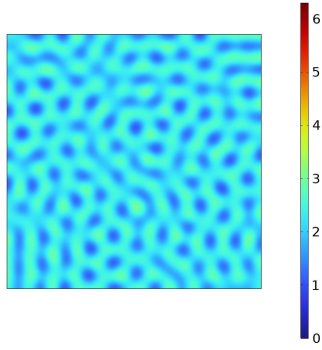
$$h_0(\mathbf{x}) = 0 \quad (3.6c)$$

dove, la (3.6a) è una gaussiana, centrata nel dominio con picco 1×10^{-1} e ampiezza 1×10^{-2} , che rappresenta una neoplasia matura in termini di dimensioni.

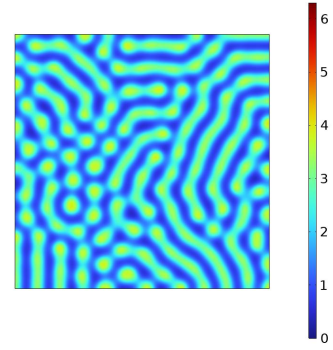
La Figura 3.3 mostra la condizione di stabilità del modello a $\beta_t = 0.1$, molto lontano dalla soglia critica di $\beta_c \simeq 0.41$. Ai diversi istanti temporali riportati, si nota un'evoluzione compatta e uniforme del fronte d'invasione e una bassa apoptosi centrale. Asintoticamente non si generano *pattern* e si raggiunge l'uniformità spaziale.

La Figura 3.4 illustra la dinamica spazio-temporale a sei istanti per la simulazione con sensibilità $\beta_t = 0.41$, a partire dalla condizione iniziale gaussiana (3.6a). Trattandosi di una sensibilità prossima alla soglia $\beta_c \simeq 0.41$, il tasso di crescita lineare massimo $\Lambda_{\max} \simeq 1.11 \cdot 10^{-2}$ è basso e l'instabilità si sviluppa lentamente: la scala temporale caratteristica $\tau_{\text{grow}} \sim 1/\Lambda_{\max}$ è dell'ordine di qualche decina di unità adimensionali, coerentemente con quanto si osserva nei pannelli successivi.

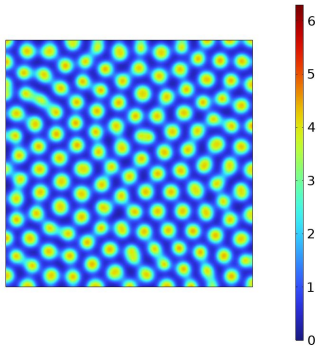
Nei primi istanti la massa tumorale si espande come un disco compatto guidato dal termine di proliferazione: a $\tau = 5$ (Figura 3.4b) la dinamica è ancora dominata dal contributo reattivo non destabilizzato, e si nota già la formazione di una zona centrale di bassa densità, biologicamente compatibile con la necrosi/ipossia



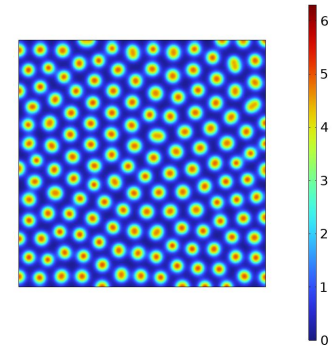
(a) *Pattern* asintotico con $\beta_t = 0.41$
($s_T = 1.29 \times 10^{-2}$ /Ms).



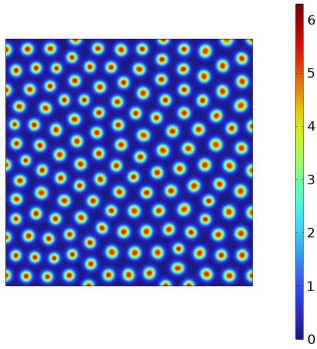
(b) *Pattern* asintotico con $\beta_t = 0.45$
($s_T = 1.41 \times 10^{-2}$ /Ms).



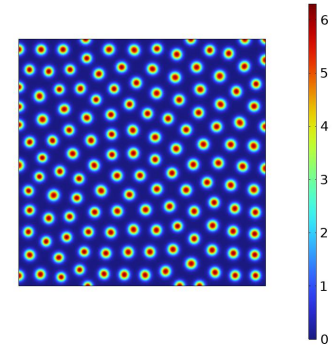
(c) *Pattern* asintotico con $\beta_t = 0.50$
($s_T = 1.6 \times 10^{-2}$ /Ms).



(d) *Pattern* asintotico con $\beta_t = 0.60$
($s_T = 1.88 \times 10^{-2}$ /Ms).

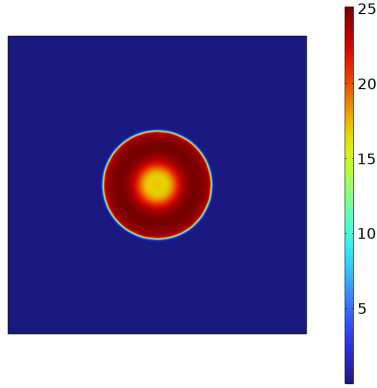


(e) *Pattern* asintotico con $\beta_t = 0.80$
($s_T = 2.25 \times 10^{-2}$ /Ms).

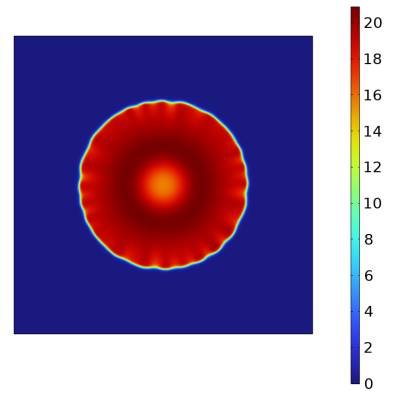


(f) *Pattern* asintotico con $\beta_t = 1.00$
($s_T = 3.13 \times 10^{-2}$ /Ms).

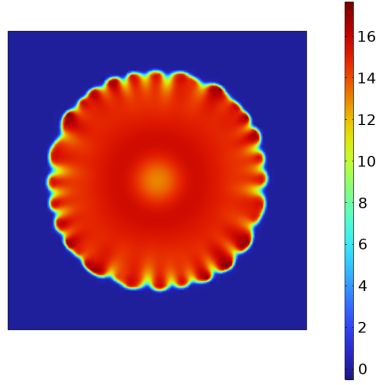
Figura 3.2: *Pattern* delle cellule tumorali c all'istante asintotico $\tau = 250$ a proliferazione fissata ($\gamma_t = 400$) e al variare della sensibilità all'acidificazione del *TME*, ovvero del solo parametro β_t . La condizione iniziale è data da (3.8b); la griglia computazionale è triangolare libera con risoluzione spazialmente omogenea nel dominio.



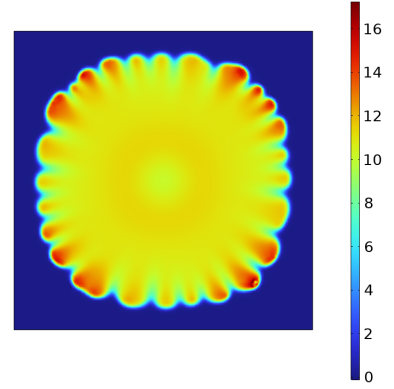
(a) Dinamica a $\tau = 5$.



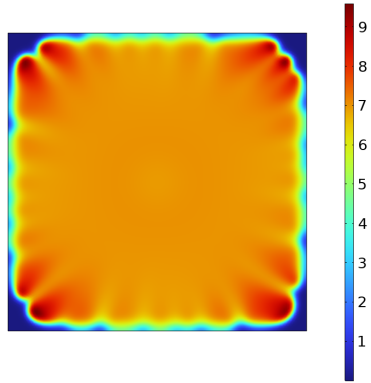
(b) Dinamica a $\tau = 10$.



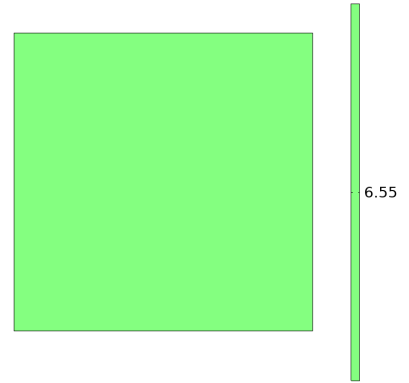
(c) Dinamica a $\tau = 15$.



(d) Dinamica a $\tau = 20$.



(e) Dinamica a $\tau = 35$.



(f) Dinamica a $\tau = 215$.

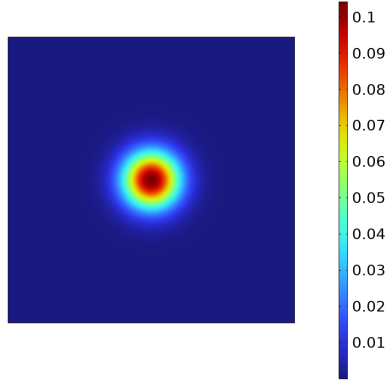
Figura 3.3: Dinamica spazio-temporale stabile con $\gamma_t = 400$ e $\beta_t = 0.10$ ($s_T = 1.57 \times 10^{-3}$ /Ms), con condizione iniziale data da (3.6a) e griglia computazionale *ad hoc* in Figura 3.1.

osservata nei carcinomi avascolari, in cui il rapido consumo di nutrienti al centro della massa supera la capacità di rifornimento per diffusione. A $\tau = 10$ (Figura 3.4c) il fronte d'invasione mostra le prime crenellature periodiche, segnale dell'innesco dell'instabilità di Turing sul bordo del disco. Negli istanti successivi ($\tau = 15$ e $\tau = 35$, Figure 3.4d e 3.4e) il fronte si frammenta in *spot* equispaziati, riproducendo numericamente la discontinuità del fronte invasivo osservata nei tumori solidi con elevato *turnover* metabolico. L'istante finale, $\tau = 400$ (Figura 3.4f), mostra il pattern asintotico: qualitativamente analogo a quello della Figura 3.2a, ma con una distribuzione spaziale più ordinata e radialmente simmetrica, conseguenza dell'origine localizzata e simmetrica della perturbazione iniziale.

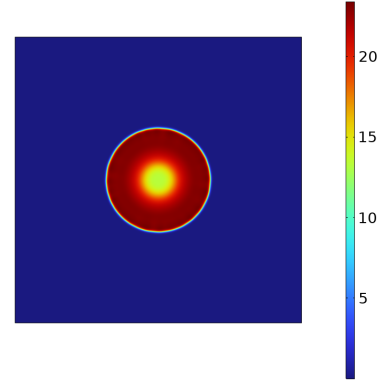
La Figura 3.5 riporta la stessa sequenza temporale per la sensibilità intermedia $\beta_t = 0.50$, valore al quale il sistema si colloca circa il 25% sopra la soglia di Turing e il tasso di crescita lineare $\Lambda_{\max} \simeq 0.12$ è circa cinque volte maggiore di quello a $\beta_t = 0.41$. Conseguentemente, l'instabilità si manifesta su scale temporali più brevi e la dinamica nonlineare entra in gioco prima.

Nelle prime tre istantanee ($\tau = 15, 25, 35$, Figure 3.5b, 3.5c e 3.5d) la dinamica è qualitativamente simile a quella di Figura 3.4: l'espansione iniziale del disco tumorale, la comparsa della regione centrale poco densa e la frammentazione del fronte avvengono a tempi confrontabili. Le differenze emergono nei pannelli successivi. A $\tau = 75$ (Figura 3.5e) la frammentazione del fronte si è propagata in larga parte del dominio e si osservano transitoriamente strutture allungate (strisce) intermedie fra i filamenti continui osservati a β_t vicino alla soglia e gli *spot* isolati osservati a β_t alta. Queste *stripes* sono un fenomeno di selezione nonlineare: in prossimità del punto di tangenza tra il regime di filamenti e quello di macchie, il sistema attraversa transitoriamente uno stato intermedio prima di stabilizzarsi. A $\tau = 500$ (Figura 3.5f) la transizione si è completata: i filamenti si sono frammentati in macchie circolari relativamente uniformi, organizzati in un reticolo quasi-uniforme con qualche difetto, in pieno accordo con il pannello 3.2c della Figura 3.2.

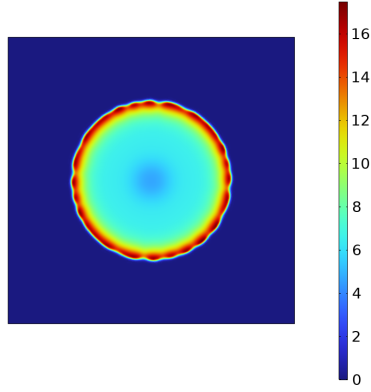
La Figura 3.6 mostra la simulazione alla sensibilità massima esplorata, $\beta_t = 1.00$, in cui il tasso di crescita lineare raggiunge $\Lambda_{\max} \simeq 0.71$, oltre cinque volte quello del caso $\beta_t = 0.50$. La dinamica è qui dominata dall'instabilità di Turing fin dai primi istanti. Già a $\tau = 5$ (Figura 3.6a) si nota che la regione centrale della massa neoplastica è sensibilmente più estesa rispetto al pannello corrispondente a $\beta_t = 0.50$ (Figura 3.5a): qui, l'apoptosi indotta dall'acidità è più incisiva e svuota più rapidamente il nucleo della massa tumorale. Tra $\tau = 10$ e $\tau = 25$ (Figure 3.6b e 3.6d) il fronte d'invasione si frammenta in *spot* ben isolati, con minore connessione fra gli stessi rispetto al caso a β_t intermedio: il sistema giunge direttamente nel regime di *spot* senza passare per la fase intermedia a strisce. A $\tau = 50$ (Figura 3.6e) il *pattern* occupa quasi tutto il dominio e mostra già la struttura asintotica. L'istante finale (Figura 3.6f) presenta un reticolo di *spot* circolari isolati, con una spaziatura nettamente più regolare e contorni più definiti rispetto al pattern



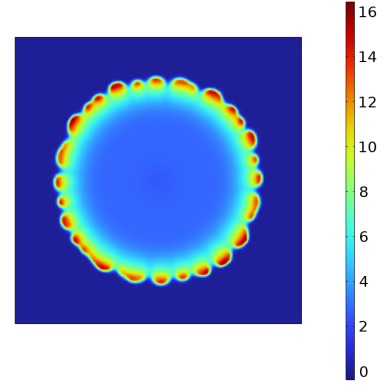
(a) Condizione iniziale ($\tau = 0$).



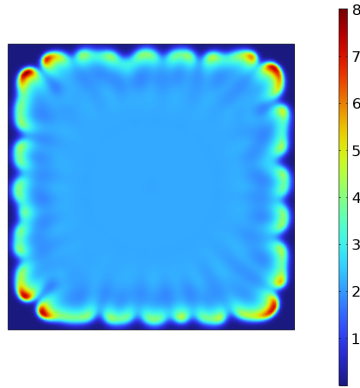
(b) Dinamica a $\tau = 5$.



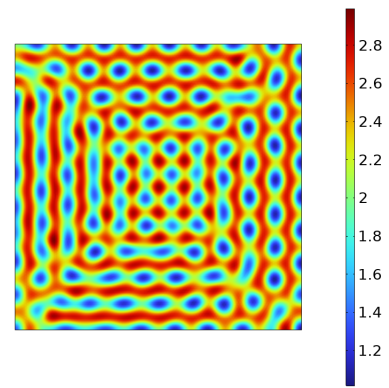
(c) Dinamica a $\tau = 10$.



(d) Dinamica a $\tau = 15$.

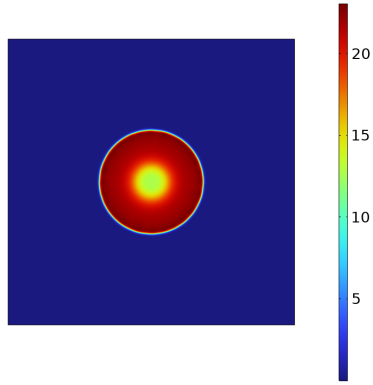


(e) Dinamica a $\tau = 35$.

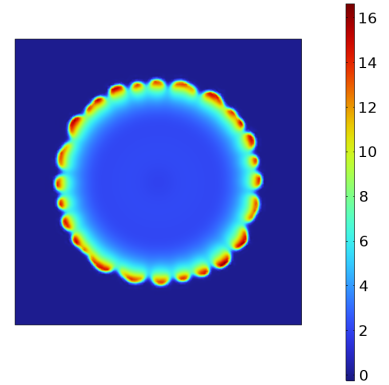


(f) Dinamica a $\tau = 500$.

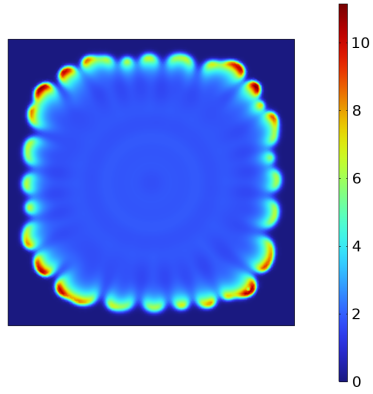
Figura 3.4: Dinamica spazio-temporale dei *pattern* delle cellule tumorali c con $\gamma_t = 400$ e $\beta_t = 0.41$ ($s_T = 1.29 \times 10^{-2}$ /Ms), con condizione iniziale data da (3.6a) e griglia computazionale *ad hoc* in Figura 3.1.



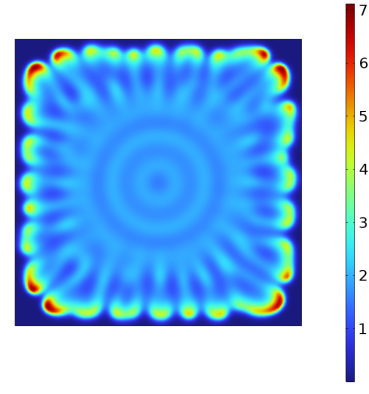
(a) Dinamica a $\tau = 5$.



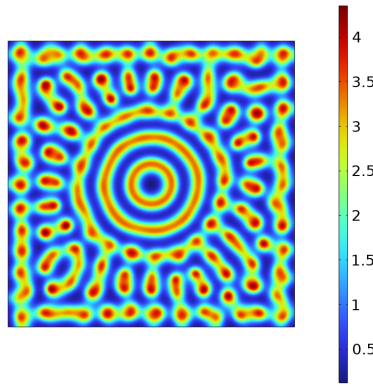
(b) Dinamica a $\tau = 15$.



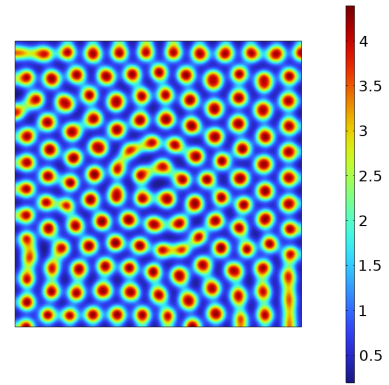
(c) Dinamica a $\tau = 25$.



(d) Dinamica a $\tau = 35$.



(e) Dinamica a $\tau = 75$.



(f) Dinamica a $\tau = 500$.

Figura 3.5: Dinamica spazio-temporale dei *pattern* delle cellule tumorali c con $\gamma_t = 400$ e $\beta_t = 0.50$ ($s_T = 1.6 \times 10^{-2}$ /Ms), con condizione iniziale data da (3.6a) e griglia computazionale *ad hoc* in Figura 3.1.

asintotico a $\beta_t = 0.50$ (Figura 3.5f). Quantitativamente, la lunghezza d'onda di Turing λ_T predetta dall'analisi lineare passa da $\simeq 0.091$ a $\simeq 0.100$ tra $\beta_t = 0.50$ e $\beta_t = 1.00$; la modesta dilatazione della scala spaziale è coerente con la maggior separazione fra le macchie visibile nel confronto appena discusso. La selezione del motivo ricorrente è qui particolarmente pulita: la dinamica è veloce, priva di stati intermedi, e il sistema converge rapidamente al reticolo di *spot* di Turing.

Si precisa che, la scelta di una condizione iniziale che rispecchi un agglomerato di cellule tumorali già spazialmente ampio (3.6a) è dettata dall'elevato costo computazionale necessario per infittire la *mesh* al diminuire del diametro del conglomerato cellulare. Per questo, si è indagata la sola dinamica instabile per la più alta sensibilità all'acidificazione del *TME* trattata in questo lavoro ($\beta_t = 1$). La griglia computazionale è stata infittita sufficientemente, come illustrato in Figura 3.7, per riuscire a catturare opportunamente la dinamica del sistema. La condizione iniziale (3.7a) per le cellule tumorali ha una concentrazione di picco pari alla metà e un diametro pari ad un decimo della precedente (3.6a):

$$c_0(\mathbf{x}) = 0.005 \cdot \exp\left(-\frac{(x - L/2)^2 + (y - L/2)^2}{0.001}\right) \quad (3.7a)$$

$$n_0(\mathbf{x}) = 1 \quad (3.7b)$$

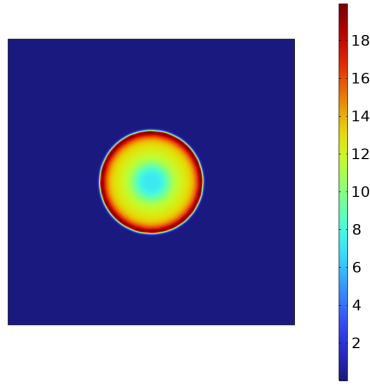
$$h_0(\mathbf{x}) = 0 \quad (3.7c)$$

I risultati riportati in Figura 3.8 mostrano sin dai primi istanti temporali la formazione e crescita di un fronte d'invasione non uniforme, che a $\tau = 7$ si frammenta definitivamente per poi proseguire, dando origine ad una distribuzione spaziale delle macchie pressoché uniforme. In particolare, si nota come l'apoptosi cellulare al centro della massa non si verifichi sin dai primi istanti, come accade per gli agglomerati più grandi, dove si verifica subito. Questo è coerente con la migliore diffusione dei nutrienti attraverso il fronte cellulare meno spesso.

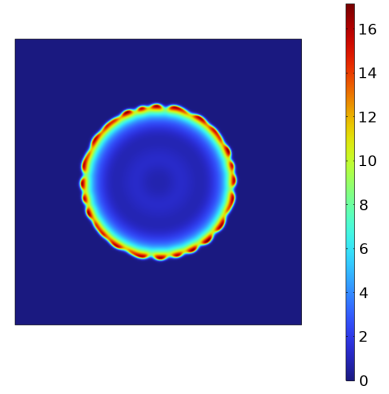
Per completare l'analisi e giustificare la scelta del valore operativo $\gamma_t = 400$ adottato finora, si presenta un'esplorazione complementare in cui γ_t viene variato su un insieme rappresentativo di valori, mantenendo β_t fissato su due regimi del parametro di controllo: uno vicino alla soglia di Turing ($\beta_t = 0.41$, Figura 3.9) e uno in regime nonlineare consolidato ($\beta_t = 1$, Figura 3.10). L'obiettivo è isolare il ruolo della proliferazione cellulare nella dinamica del fronte d'invasione.

In Figura 3.9, è evidente che, a parità di istante temporale considerato e sensibilità, maggiore è il tasso di proliferazione e più velocemente evolve la dinamica di espansione ed invasione. In aggiunta, all'aumentare di γ_t si denota una tendenza a formare *pattern* connessi, come filamenti, e non singole macchie.

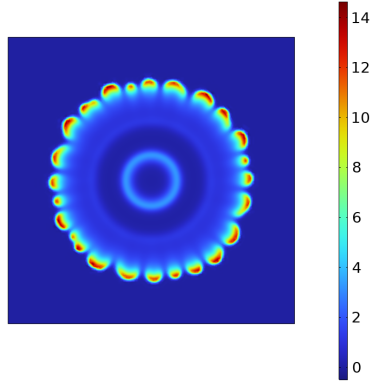
Mentre in Figura 3.10, sempre all'istante $\tau = 100$ ma con una maggiore sensibilità $\beta_t = 1$, la dinamica instabile è guidata solamente dalla formazione di



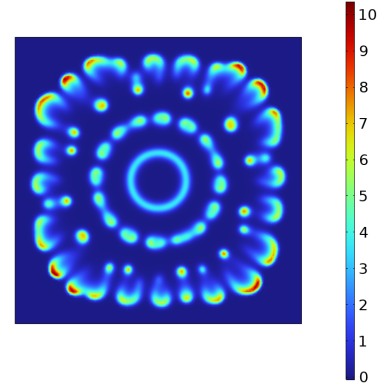
(a) Dinamica a $\tau = 5$.



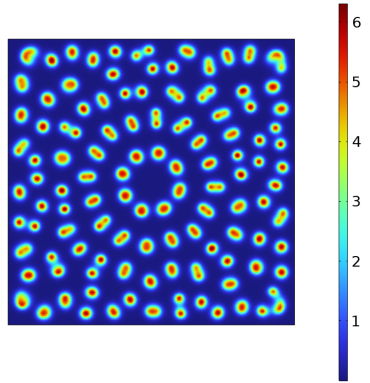
(b) Dinamica a $\tau = 10$.



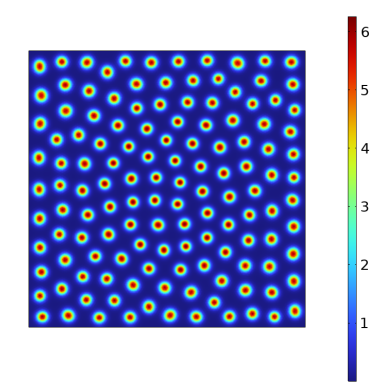
(c) Dinamica a $\tau = 15$.



(d) Dinamica a $\tau = 25$.



(e) Dinamica a $\tau = 50$.



(f) Dinamica a $\tau = 250$.

Figura 3.6: Dinamica spazio-temporale dei *pattern* delle cellule tumorali c con $\gamma_t = 400$ e $\beta_t = 1.00$ ($s_T = 3.13 \times 10^{-2}$ /Ms), con condizione iniziale data da (3.6a) e griglia computazionale *ad hoc* in Figura 3.1.

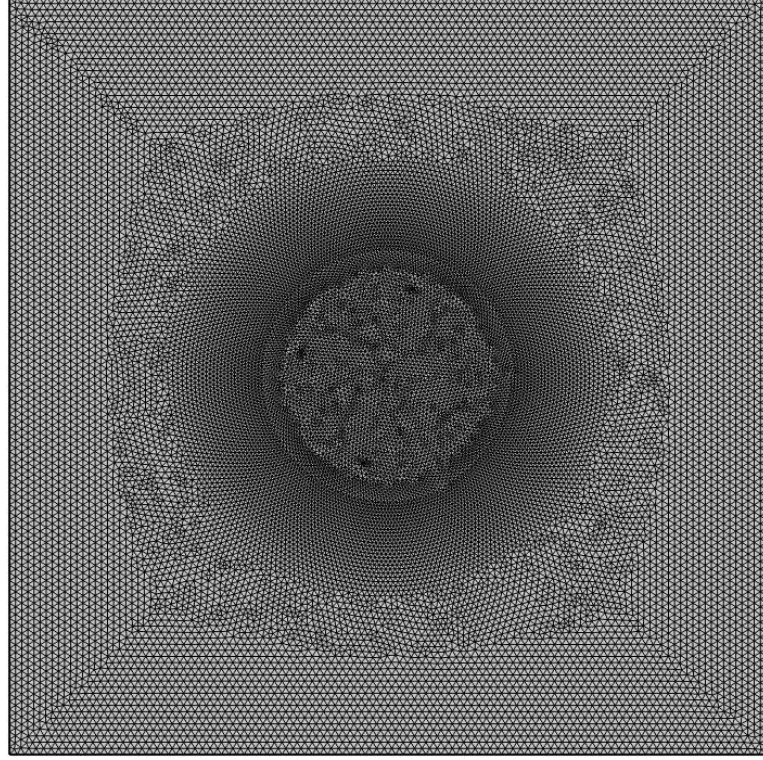


Figura 3.7: Griglia computazionale riadattata per la risoluzione della dinamica del modello (2.5) con condizioni iniziali (3.7).

macchie che si formano e distribuiscono nello spazio con una velocità che aumenta in relazione all'aumento di γ_t .

In sintesi, le simulazioni presentate nella Sezione 3.3 confermano l'instabilità innescata dall'acidificazione del *TME* presentata dall'analisi di stabilità lineare di Sezione 2.3.2. Emergono distintamente i ruoli dei due parametri del modello, γ_t e β_t .

La proliferazione γ_t , esplorata nelle Figure 3.9 e 3.10, agisce come acceleratore della dinamica: maggiore è γ_t , più rapidamente il fronte d'invasione si propaga e il *pattern* si organizza nello spazio. A γ_t molto piccoli ($\gamma_t = 5$) la dinamica reattiva è lenta e lo stato instabile si sviluppa in tempi più lunghi, mentre a γ_t elevati il sistema raggiunge la configurazione asintotica entro poche unità adimensionali τ . La proliferazione modula anche la connettività spaziale del *pattern*: a β_t vicino alla soglia critica, γ_t grandi favoriscono strutture filamentose connesse, mentre a β_t

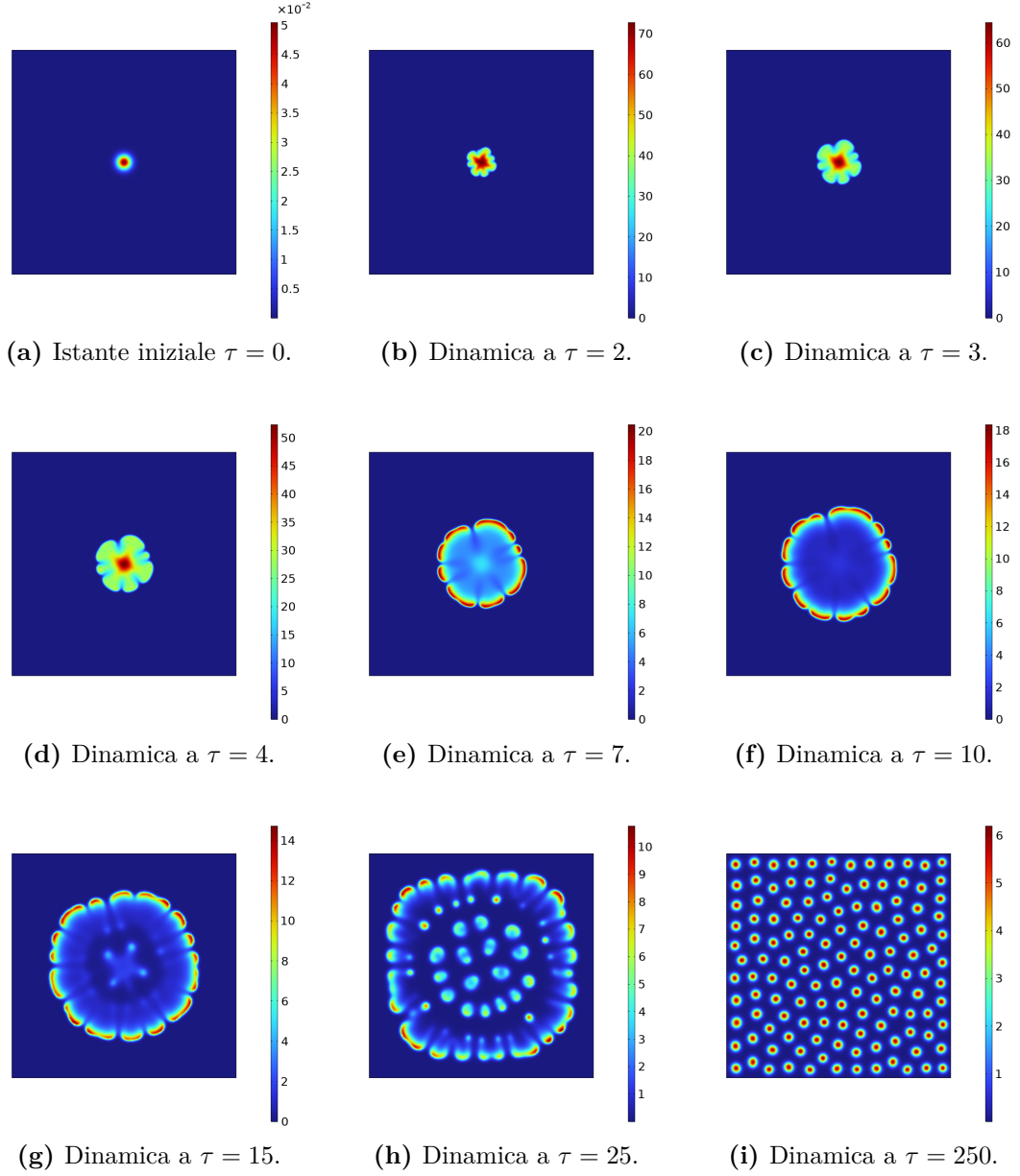
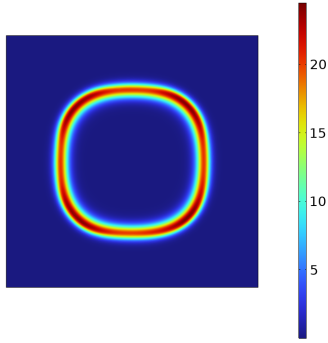
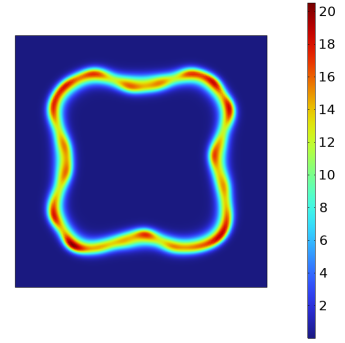


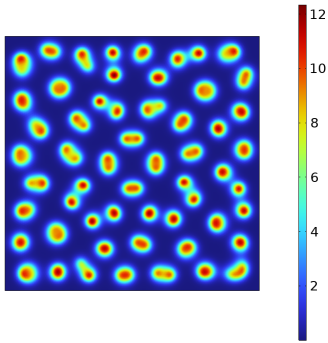
Figura 3.8: Dinamica spazio-temporale dei *pattern* delle cellule tumorali c con $\gamma_t = 400$ e $\beta_t = 1.00$ ($s_T = 3.13 \times 10^{-2}$ /Ms), con condizione iniziale data da (3.7a) e griglia computazionale *ad hoc* in Figura 3.7.



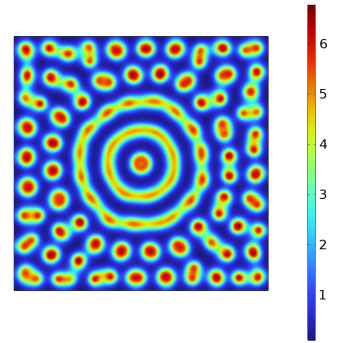
(a) Pattern all'istante $\tau = 100$ con $\beta_t = 0.41$ e $\gamma_t = 5$.



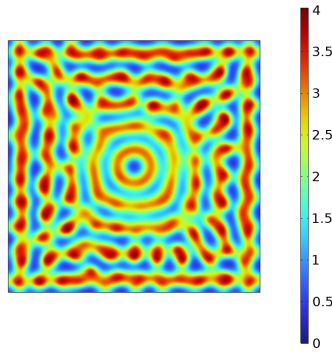
(b) Pattern all'istante $\tau = 100$ con $\beta_t = 0.41$ e $\gamma_t = 10$.



(c) Pattern all'istante $\tau = 100$ con $\beta_t = 0.41$ e $\gamma_t = 50$.

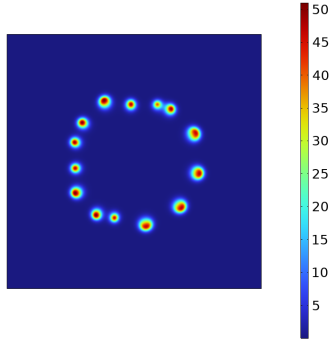


(d) Pattern all'istante $\tau = 100$ con $\beta_t = 0.41$ e $\gamma_t = 150$.

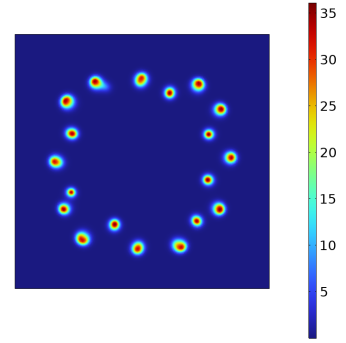


(e) Pattern all'istante $\tau = 100$ con $\beta_t = 0.41$ e $\gamma_t = 300$.

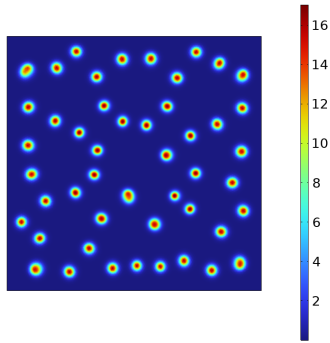
Figura 3.9: Pattern delle cellule tumorali c all'istante $\tau = 100$ con bassa sensibilità all'acidificazione del microambiente tumorale ($\beta_t = 0.41$ oppure $s_T = 1.29 \times 10^{-2}$ /Ms) e con proliferazione cellulare variabile. La condizione iniziale è data da (3.6a); la griglia computazionale è triangolare libera con risoluzione *ad hoc* (3.1).



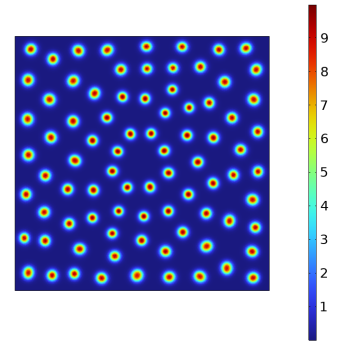
(a) *Pattern* all'istante $\tau = 100$ con $\gamma_t = 5$.



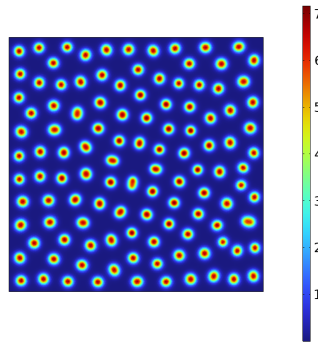
(b) *Pattern* all'istante $\tau = 100$ con $\gamma_t = 10$.



(c) *Pattern* all'istante $\tau = 100$ con $\gamma_t = 50$.



(d) *Pattern* all'istante $\tau = 100$ con $\gamma_t = 150$.



(e) *Pattern* all'istante $\tau = 100$ con $\gamma_t = 300$.

Figura 3.10: *Pattern* delle cellule tumorali c all'istante $\tau = 100$ con alta sensibilità all'acidificazione del microambiente tumorale ($\beta_t = 1.00$ oppure $s_T = 3.13 \times 10^{-2}$ /Ms) e con proliferazione cellulare variabile. Le condizioni iniziali sono date da (3.6a); la griglia computazionale è triangolare libera con risoluzione *ad hoc* (3.1).

elevati il regime di macchie isolate è raggiunto indipendentemente dal valore di γ_t , segno che la morfologia asintotica è governata principalmente da β_t .

La sensibilità all'acidosi β_t , esplorata nelle Figure 3.2, 3.4, 3.5 e 3.6 a $\gamma_t = 400$ fissato, è il vero parametro di controllo della biforcazione. La condizione iniziale stocastica di Figura 3.2 mostra come la morfologia del *pattern* asintotico (filamenti $\rightarrow$ strisce transitorie $\rightarrow$ macchie) sia selezionata da β_t in modo continuo, mentre la lunghezza d'onda caratteristica rimane sostanzialmente costante e coincide con quella predetta dall'analisi lineare. In particolare, la lunghezza d'onda λ_T teorica passa da $\simeq 0.091$ a $\simeq 0.100$ tra $\beta_t = 0.50$ e $\beta_t = 1.00$, in accordo con la spaziatura osservata fra gli *spot* dei pannelli corrispondenti. Le simulazioni a neoplasia centrale (Figure 3.4, 3.5, 3.6) aggiungono l'informazione sull'evoluzione temporale: il fronte d'invasione, partendo da una massa neoplastica regolare e localizzata, si destabilizza e si frammenta in *pattern* di Turing su scale temporali tanto più brevi quanto β_t è grande, coerentemente con la crescita lineare $\tau_{\text{grow}} \sim 1/\Lambda_{\text{max}}$, che passa da $\simeq 90$ unità adimensionali, a $\beta_t = 0.41$, fino a $\simeq 1.4$, a $\beta_t = 1.00$. Il caso $\beta_t = 0.10$ (Figura 3.3), ben al di sotto della soglia $\beta_c \simeq 0.41$, funge da controllo negativo: il fronte d'invasione si propaga in modo uniforme e il sistema converge asintoticamente allo stato omogeneo, coerentemente alla predizione lineare secondo cui $\Lambda_{\text{max}} < 0$ per $\beta_t < \beta_c$. La transizione fra il regime stabile e quello instabile è quindi una vera biforcazione di Turing.

L'esperimento a condizione iniziale gaussiana di piccola ampiezza (Figura 3.8) mostra, infine, che la formazione del *pattern* è robusta rispetto alla dimensione iniziale del *cluster* cellulare. Anche partendo da un microagglomerato di concentrazione e raggio caratteristico dieci volte inferiore a quello usato negli altri esperimenti, il fronte si frammenta in *spot* con lunghezza d'onda confrontabile e spaziatura quasi uniforme. La differenza qualitativa rispetto agli agglomerati più grandi riguarda la dinamica della regione centrale: per il *cluster* piccolo, l'apoptosi acido-indotta nel nucleo non compare nei primi istanti. Ciò accade perché la diffusione dei nutrienti attraverso il fronte sottile compensa il consumo locale. Invece, per gli agglomerati maggiormente formati la zona centrale di necrosi/ipossia compare immediatamente, in piena analogia con la fenomenologia clinica dei carcinomi solidi avascolari, in cui la massa tumorale è troppo spessa perché l'ossigeno e i nutrienti diffondano fino al nucleo più velocemente della proliferazione cellulare incontrollata.

Complessivamente, i risultati di Sezione 3.3 dimostrano che il modello a singola popolazione cattura simultaneamente tre fenomeni qualitativi indipendenti sperimentalmente osservati: la formazione spontanea di cluster cellulari a partire da una distribuzione uniforme o localizzata; la selezione morfologica dipendente dal fenotipo aggressivo (sensibilità all'acidosi β_t); la zona di necrosi centrale che precede la frammentazione del fronte d'invasione. La concordanza quantitativa tra le lunghezze d'onda predette dall'analisi lineare e quelle osservate nelle simulazioni non lineari fornisce un'ulteriore validazione *a posteriori* della procedura di calibrazione

adottata in Sezione 3.2.

3.4 Pattern nel Secondo Modello

L'analisi numerica del modello a due popolazioni (2.28) estende al nuovo caso lo studio condotto in Sezione 3.3, affiancando alla popolazione neoplastica c_t la popolazione di cellule sane c_h . Il primo passo è stato la verifica dell'effettiva insorgenza dell'instabilità a partire da una perturbazione stocastica dello stato omogeneo, imponendo le condizioni iniziali:

$$c_{h,0}(\mathbf{x}) = 1 \quad (3.8a)$$

$$c_{t,0}(\mathbf{x}) = 0.5 + \text{rn1}(x, y) \quad (3.8b)$$

$$n_0(\mathbf{x}) = 1 \quad (3.8c)$$

$$h_0(\mathbf{x}) = 0 \quad (3.8d)$$

La perturbazione $\text{rn1}(x, y)$ è un rumore di piccola ampiezza sovrapposto a uno stato spazialmente uniforme: il sistema, lasciato libero di evolvere, amplifica spontaneamente i modi spaziali instabili previsti dall'analisi di stabilità lineare di Sezione 2.4.2, rompendo la simmetria dello stato omogeneo. Verificata l'insorgenza dei *pattern* e validati così i *set* di parametri, si procede ad illustrare le simulazioni condotte per le due coppie di esponenti di proliferazione $(\zeta_1, \varphi_1) = (1, 2)$ e $(\zeta_2, \varphi_2) = (1, 5/4)$, facendo variare la sensibilità all'acidosi β_t e la proliferazione tumorale γ_t .

Le Figure 3.11, 3.12 e 3.13 riproducono diversi scenari di una dinamica *in vitro*: su un campione inizialmente popolato dalle sole cellule sane si innesta un piccolo agglomerato neoplastico e se ne segue l'evoluzione fino al regime asintotico. Rispetto al modello a singola popolazione, la presenza del tessuto sano introduce un sensibile rallentamento della crescita e dell'organizzazione spaziale della massa tumorale. Le cellule sane non riescono a sostenersi e si estinguono asintoticamente, lasciando sola la popolazione neoplastica a causa della transizione fenotipica e la morte da contatto. Per tutte le simulazioni che si illustreranno, dunque, si è deciso di partire dalle condizioni iniziali:

$$c_{h,0}(\mathbf{x}) = 1 \quad (3.9a)$$

$$c_{t,0}(\mathbf{x}) = 0.1 \cdot \exp\left(-\frac{(x - L/2)^2 + (y - L/2)^2}{0.003}\right) \quad (3.9b)$$

$$n_0(\mathbf{x}) = 1 \quad (3.9c)$$

$$h_0(\mathbf{x}) = 0 \quad (3.9d)$$

La Figura 3.11 raccoglie, accanto alla condizione iniziale (3.9) riprodotta nel pannello 3.11a, tre configurazioni asintotiche del *pattern* tumorale c_t ottenute

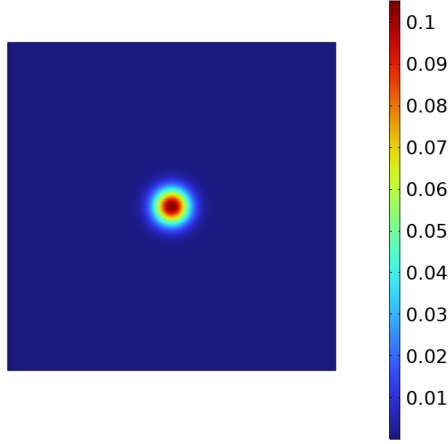
fissando gli esponenti $\zeta_1 = 1$ e $\varphi_1 = 2$ e la proliferazione $\gamma_t = 400$, e facendo variare la sola sensibilità all'acidosi β_t . Il confronto con l'analogo esperimento a singola popolazione (Figura 3.4) mette in luce, prima di tutto, un netto rallentamento della dinamica: la competizione per lo spazio e per i nutrienti con le cellule sane c_h ritarda la destabilizzazione del fronte, al punto che la configurazione asintotica a $\beta_t = 0.41$ viene raggiunta solo a $\tau = 1500$, contro le poche centinaia di unità adimensionali sufficienti nel modello a una popolazione.

Sul piano morfologico si ritrova la stessa transizione governata da β_t già descritta in Sezione 3.3. In prossimità della soglia, nel pannello 3.11b ($\beta_t = 0.41$), la massa neoplastica si organizza in una struttura labirintica e connessa di filamenti e *cluster* contigui, disposti in anelli concentrici che conservano la memoria della posizione del seme iniziale; l'ampiezza di c_t resta confinata in un intervallo ristretto e il fondo non si annulla mai del tutto. All'aumentare della sensibilità all'acidosi i filamenti si rompono progressivamente: nel pannello 3.11c ($\beta_t = 0.60$) il *pattern* è già un fitto reticolo di *spot*, mentre nel pannello 3.11d ($\beta_t = 1.00$) si osservano macchie circolari isolate, ben separate e disposte su un fondo prossimo allo zero. La transizione da filamenti a *spot* è, dunque, continua e controllata da β_t ; parallelamente, il picco di densità tumorale cresce con la sensibilità, segno che le cellule superstiti si raccolgono in aggregati sempre più densi e localizzati man mano che il microambiente diventa ostile.

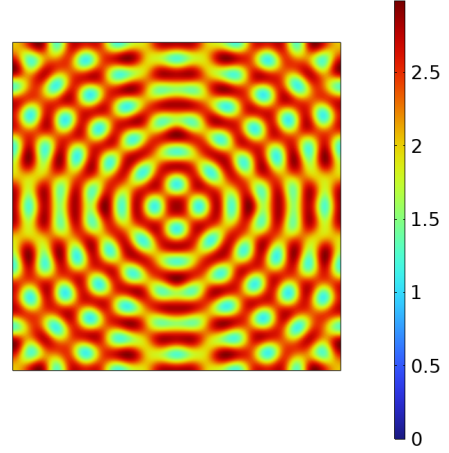
La Figura 3.12 confronta a coppie le configurazioni asintotiche ottenute, a parità di esponenti $\zeta_1 = 1$ e $\varphi_1 = 2$, fissando di volta in volta la sensibilità β_t e facendo variare la proliferazione γ_t di un fattore dieci, da $\gamma_t = 5$ a $\gamma_t = 50$. L'effetto del fenotipo proliferativo emerge con chiarezza: a β_t fissato, la neoplasia più aggressiva frammenta la massa tumorale in un numero molto maggiore di *spot*, più piccoli, più ravvicinati e con un picco di densità inferiore, ma con una copertura complessiva del dominio nettamente superiore.

Il caso limite è quello dei pannelli 3.12a e 3.12b, in cui a sensibilità minima ($\beta_t = 0.17$) e a bassa proliferazione ($\gamma_t = 5$) si formano ancora *spot* ampi e diffusi, mentre a $\gamma_t = 50$ l'instabilità spaziale non riesce ad emergere e il sistema evolve verso la saturazione di cellule tumorali, in cui il *pattern* è del tutto assente. Allontanandosi dalla soglia, nei pannelli 3.12c, 3.12d, 3.12e, 3.12f, 3.12g e 3.12h la frammentazione in *spot* si ripristina per entrambi i valori di γ_t , dove il divario di densità resta marcato. Il fenotipo aggressivo colonizza il campione in modo capillare e prevale anche alle sensibilità all'acidosi più elevate, al contrario del fenotipo lento che produce poche macchie isolate. La proliferazione si conferma quindi un acceleratore della dinamica e un amplificatore della connettività spaziale del *pattern*, mentre il suo sviluppo morfologico resta dettato dall'equilibrio fra l'instabilità di Turing, controllata da β_t , e la crescita incontrollata della massa neoplastica.

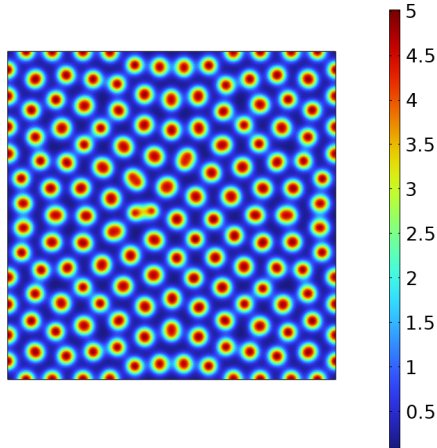
La Figura 3.13 riprende lo stesso schema di confronto a coppie, ma adotta



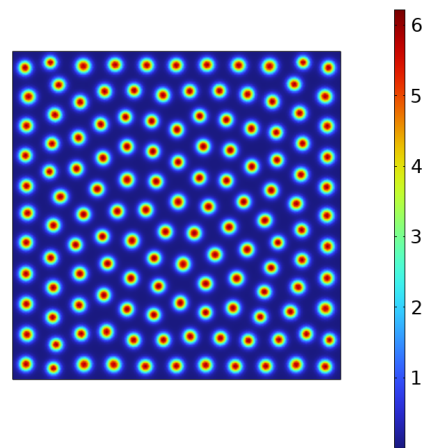
(a) Istante iniziale con condizione (3.9b).



(b) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 1500$ con $\gamma_t = 400$ e $\beta_t = 0.41$.

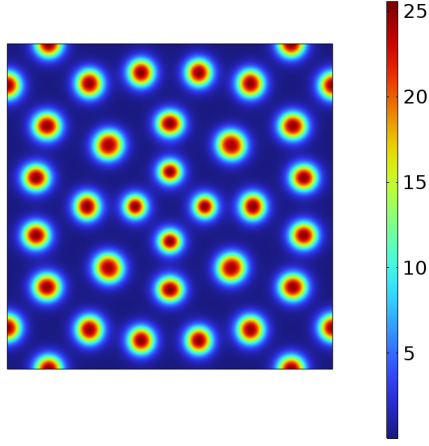


(c) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 400$ e $\beta_t = 0.60$.

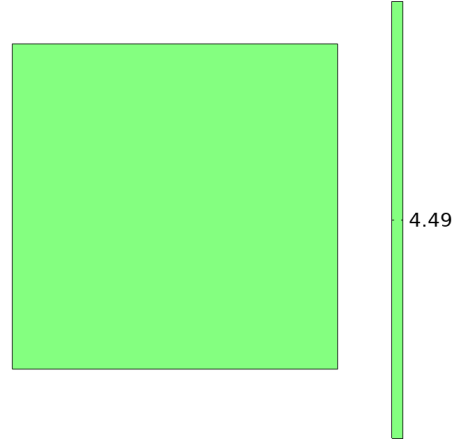


(d) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 400$ e $\beta_t = 1.00$.

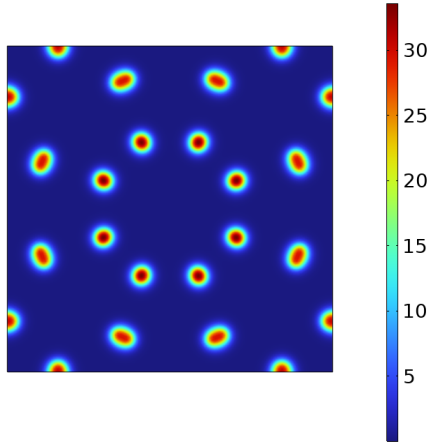
Figura 3.11: *Pattern* delle cellule tumorali c_t all'istante asintotico, dove la proliferazione cellulare è fissata e la sensibilità all'acidificazione del *TME* varia; gli esponenti sono fissati a $\zeta_1 = 1$ per le cellule sane c_h e $\varphi_1 = 2$ per le cellule tumorali c_t . La griglia computazionale è triangolare libera con risoluzione raffigurata in Figura (3.1).



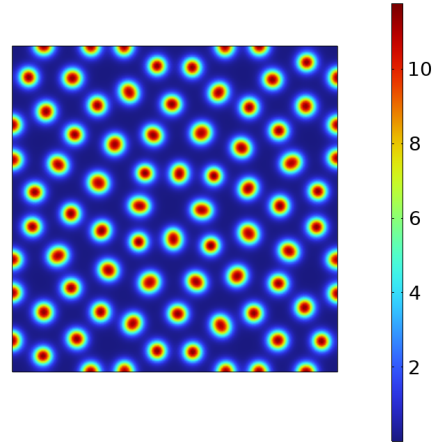
(a) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 750$ con $\gamma_t = 5$ e $\beta_t = 0.17$.



(b) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 50$ e $\beta_t = 0.17$.

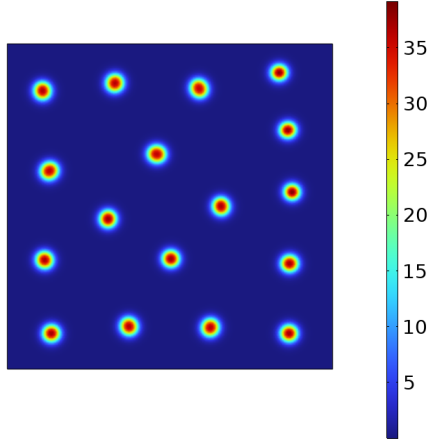


(c) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 5$ e $\beta_t = 0.41$.

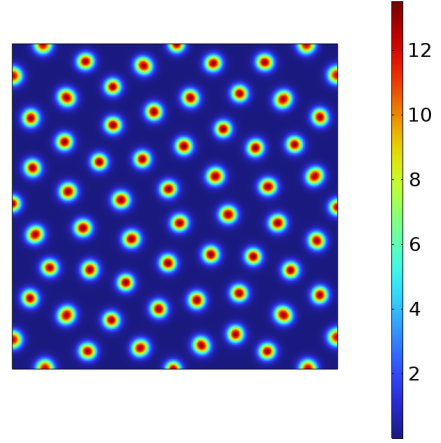


(d) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 50$ e $\beta_t = 0.41$.

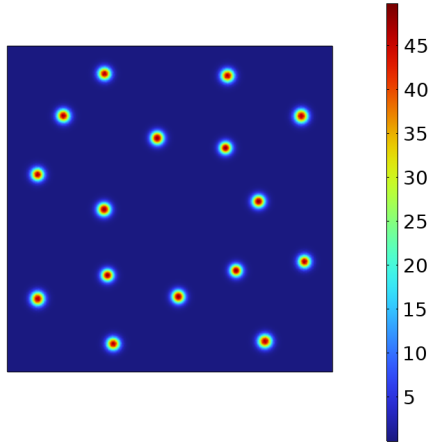
Figura 3.12: Confronto di *pattern* a coppie delle cellule tumorali c_t all'istante asintotico, dove la proliferazione cellulare e la sensibilità all'acidificazione del *TME* variano; gli esponenti sono fissati a $\zeta_1 = 1$ per le cellule sane c_h e $\varphi_1 = 2$ per le cellule tumorali c_t . La griglia computazionale è triangolare libera con risoluzione raffigurata in Figura (3.1).



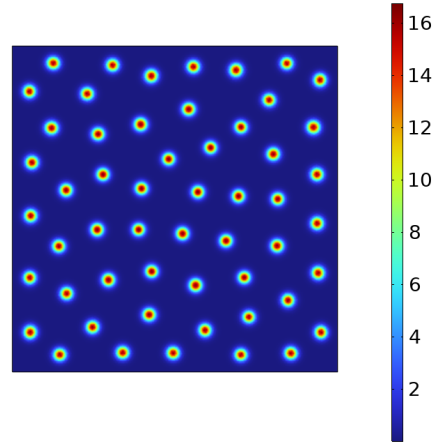
(e) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 5$ e $\beta_t = 0.60$.



(f) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 50$ e $\beta_t = 0.60$.



(g) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 5$ e $\beta_t = 1.00$.



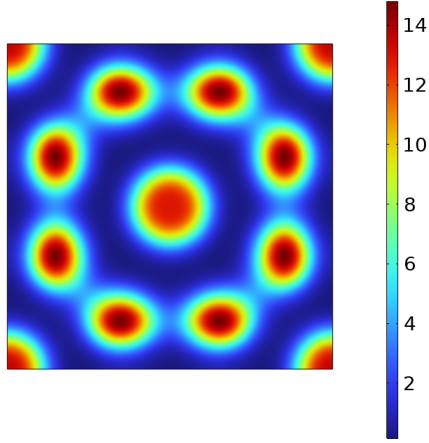
(h) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 50$ e $\beta_t = 1.00$.

Figura 3.12: Confronto di *pattern* a coppie delle cellule tumorali c_t all'istante asintotico, dove la proliferazione cellulare e la sensibilità all'acidificazione del *TME* variano; gli esponenti sono fissati a $\zeta_1 = 1$ per le cellule sane c_h e $\varphi_1 = 2$ per le cellule tumorali c_t . La griglia computazionale è triangolare libera con risoluzione raffigurata in Figura (3.1).

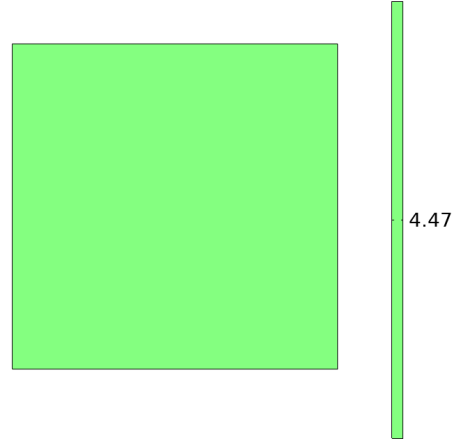
per le cellule tumorali l'esponente sub-quadratico $\varphi_2 = 5/4$, una legge di crescita ritenuta più aderente ai dati sperimentali sulla proliferazione neoplastica [24]. Le tendenze qualitative descritte nei pannelli precedenti si conservano: la frammentazione in *spot* cresce con β_t , l'infittimento del *pattern* accompagna l'aumento di γ_t e a $\beta_t = 0.17$ con $\gamma_t = 50$ si ritrova la saturazione omogenea già osservata, riprodotta nel pannello 3.13b.

La differenza sostanziale, rispetto al caso a crescita quadratica, è che i *pattern* mantengono una più spiccata organizzazione radiale. A bassa proliferazione gli *spot* non si distribuiscono in modo disordinato, ma si dispongono in anelli concentrici attorno all'aggregato centrale (pannelli 3.13a, 3.13c, 3.13e e 3.13g), conservando a lungo la memoria della condizione iniziale localizzata (3.9). La crescita sub-quadratica, infatti, conserva la massa tumorale in modo più coeso. Anche quando la sensibilità all'acidosi è elevata, il fronte si frammenta a partire da una configurazione più compatta e aggregata, come ben visibile nel pannello 3.13d, dove a $\gamma_t = 50$ e $\beta_t = 0.41$ il *pattern* assume la forma di una struttura labirintica concentrica e fittamente connessa. Il modello sub-quadratico restituisce, dunque, uno scenario di invasione qualitativamente analogo a quello a crescita quadratica, ma morfologicamente più ordinato e progressivo, in cui la frammentazione in *cluster* discreti procede in modo graduale a partire dal nucleo neoplastico.

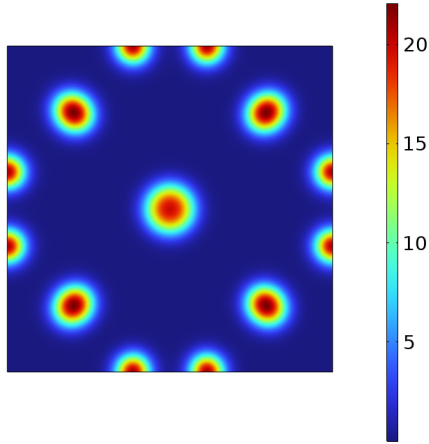
In tutte le simulazioni presentate la dinamica riprodotta è di tipo *in vitro*: il campione è un sistema chiuso, in cui non vi è rigenerazione del tessuto sano (apporto di cellule c_h). Per questa ragione, una volta innescata la transizione neoplastica, la popolazione sana non dispone di alcun meccanismo di sostegno e si esaurisce progressivamente, mentre le cellule tumorali, favorite dall'acidificazione del microambiente, prevalgono e ne occupano lo spazio. Si può concludere che l'esito asintotico comune a tutti gli scenari è la sostituzione completa del tessuto sano da parte della massa tumorale e ciò che cambia, al variare di β_t , γ_t e degli esponenti di proliferazione, non è l'esito finale della competizione, bensì la morfologia e la scala temporale con cui la massa neoplastica si organizza in *cluster* discreti. È proprio questa organizzazione spaziale, che si manifesta come filamenti, reticoli di *spot* oppure macchie isolate a costituire l'informazione di maggior interesse fornita dal modello competitivo.



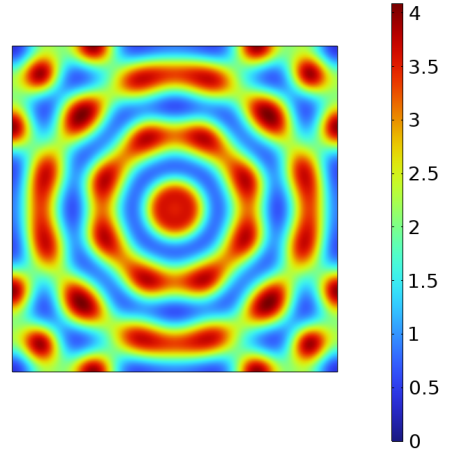
(a) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 750$ con $\gamma_t = 5$ e $\beta_t = 0.17$.



(b) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 50$ e $\beta_t = 0.17$.

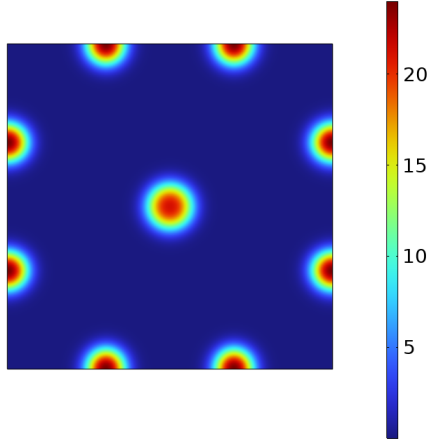


(c) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 750$ con $\gamma_t = 5$ e $\beta_t = 0.41$.

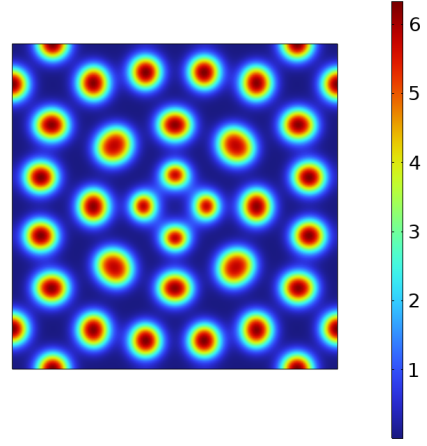


(d) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 750$ con $\gamma_t = 50$ e $\beta_t = 0.41$.

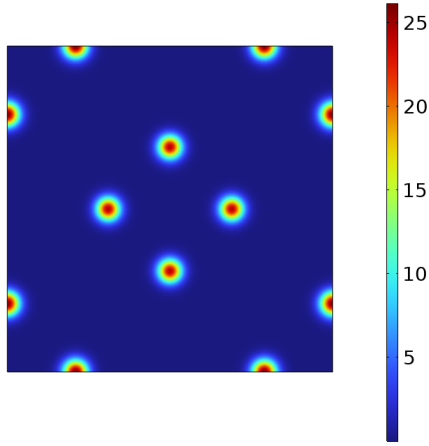
Figura 3.13: *Pattern* delle cellule tumorali c_t all'istante asintotico, dove la proliferazione cellulare e la sensibilità all'acidificazione del *TME* variano; gli esponenti sono fissati a $\zeta_2 = 1$ per le cellule sane c_h e $\varphi_2 = 1.25$ per le cellule tumorali c_t . La griglia computazionale è triangolare libera con risoluzione raffigurata in Figura (3.1).



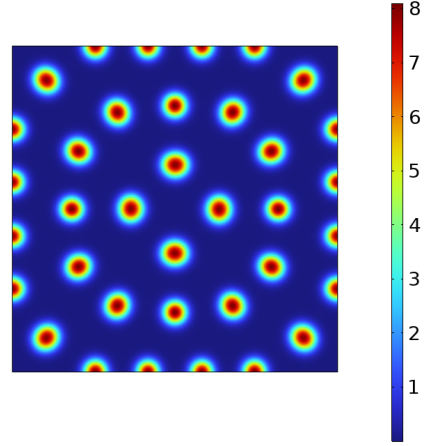
(e) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 5$ e $\beta_t = 0.60$.



(f) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 50$ e $\beta_t = 0.60$.



(g) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 5$ e $\beta_t = 1.00$.



(h) *Pattern* all'istante asintotico $\tau = 500$ con $\gamma_t = 50$ e $\beta_t = 1.00$.

Figura 3.13: *Pattern* delle cellule tumorali c_t all'istante asintotico, dove la proliferazione cellulare e la sensibilità all'acidificazione del *TME* variano; gli esponenti sono fissati a $\zeta_2 = 1$ per le cellule sane c_h e $\varphi_2 = 5/4$ per le cellule tumorali c_t . La griglia computazionale è triangolare libera con risoluzione raffigurata in Figura (3.1).

3.5 Confronto con Immagini Istologiche

Si procede ora al confronto fra alcune immagini istologiche di neoplasie reali e i *pattern* prodotti dai modelli (2.5) e (2.28). La scelta è ricaduta sul mesotelioma peritoneale nella sua forma diffusa poiché la sua modalità di crescita offre un termine di paragone adeguato. A differenza dei carcinomi solidi che si sviluppano come una massa compatta e localizzata, il mesotelioma diffuso colonizza il tessuto come un insieme di aggregati distribuiti, una fenomenologia che richiama da vicino i *cluster* discreti e i reticoli di *spot* predetti dai modelli di reazione–diffusione studiati in questa tesi.

Il mesotelioma è una neoplasia che origina dalle cellule del mesotelio, la membrana sierosa che riveste gli organi interni e le cavità del corpo, come la pleura nella cassa toracica o il peritoneo nell’addome. Nella sua variante maligna assume rilievo clinico negli uomini: in Italia, nel 2024, si stimano circa 1328 nuovi casi su 1779 totali [31]. La prevalenza maschile è riconducibile alla principale causa di rischio: l’esposizione all’amianto. Si affiancano, poi, fattori più rari come le radiazioni ionizzanti e il diossido di torio impiegato nella radiologia clinica della metà del secolo scorso. L’Organizzazione Mondiale della Sanità classifica i mesoteliomi in base all’organo di origine e alle caratteristiche delle cellule, distinguendo, inoltre, rispetto le modalità di crescita in: forme diffusa, localizzata e in situ (proliferazione ancora confinata e non invasiva) [31].

Il confronto è giustificato nella somiglianza morfologica e metabolica: infatti, come altre neoplasie maligne, anche il mesotelioma presenta un metabolismo profondamente alterato; ovvero, un marcato ricorso alla glicolisi anche in presenza di ossigeno, l’effetto Warburg discusso nel Capitolo 1. Questo assetto metabolico comporta una produzione di acido lattico e un’acidificazione del microambiente coerenti con il *feedback* negativo pH-dipendente posto alla base dei modelli. Il mesotelioma diffuso costituisce, quindi, non soltanto un riscontro visivo, ma anche un caso biologicamente affine al meccanismo proposto.

Le immagini che seguono mostrano alcune immagini di mesoteliomi pleurico (Figura 3.14) e peritoneale (Figura 3.15 e 3.16) diffusi, che si sviluppano come una popolazione di aggregati distribuiti nei tessuti. Questa duplice modalità di presentazione, diffusa e localizzata, trova un parallelismo diretto nelle due condizioni iniziali adottate nelle simulazioni: la perturbazione stocastica di uno stato spazialmente uniforme, che riproduce l’insorgenza di *cluster* distribuiti a partire da un tessuto omogeneo, e l’agglomerato neoplastico localizzato, che ne descrive invece l’evoluzione e la frammentazione a partire da una massa compatta. Il confronto accosta configurazioni asintotiche dei modelli alle immagini istologiche, cercando in quest’ultime un riscontro qualitativo della morfologia predetta dai modelli in *cluster*.

La Figura 3.14 mostra organoidi derivati da mesotelioma pleurico maligno

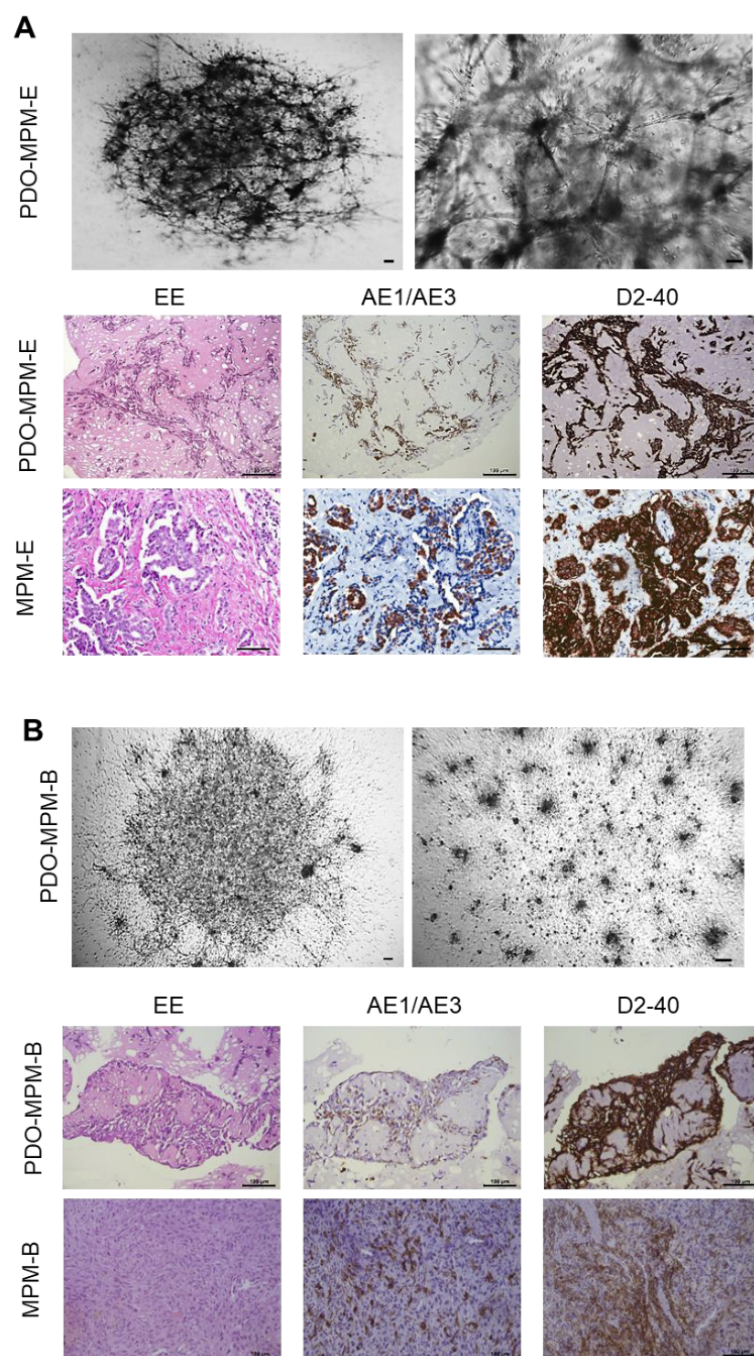


Figura 3.14: Valutazione istologica di organoidi derivati da mesotelioma pleurico maligno (PDO-MPM). Le colorazioni ematossilina-eosina (EE) e immunoistochimica (AE1/AE3, D2-40) evidenziano la morfologia di due linee cellulari: PDO-MPM-E (variante epitelioidi, strutture ramificate complesse) e PDO-MPM-B (variante bifasica, focolai neoplastici dispersi nel substrato). Barre di scala indicate in figura [29].

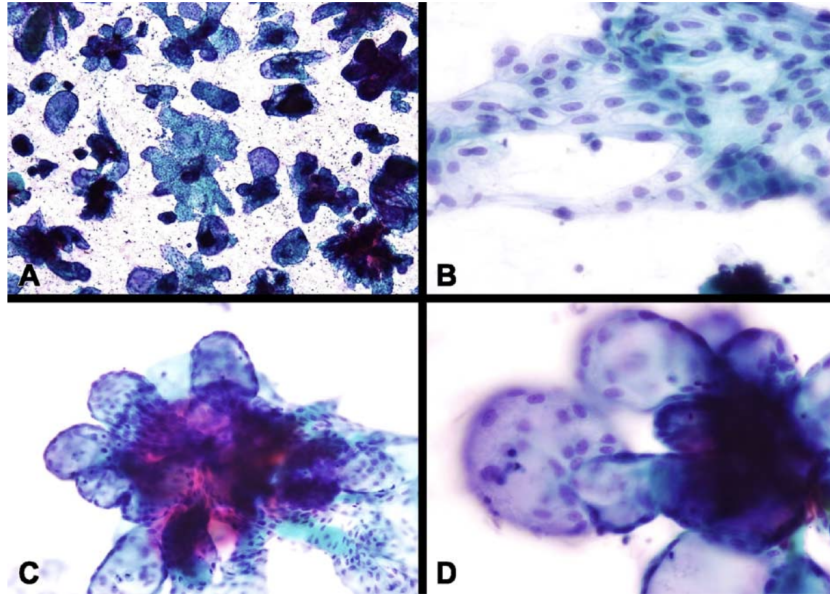


Figura 3.15: Morfologia delle strutture papillari nel mesotelioma papillare ben differenziato del peritoneo (WDPM). Pannello A: rappresentazione a basso ingrandimento con numerose papille distribuite sulla superficie peritoneale. Pannello B: foglietti piatti di cellule mesoteliali con nuclei uniformi. Pannello C: struttura delicata delle papille. Pannello D: dettaglio ad alto ingrandimento delle cellule componenti [9].

(*patient-derived organoids*, PDO-MPM), ottenuti da coltura *ex vivo* di campioni biotipici di pazienti [29]. Le colorazioni istologiche evidenziano aggregati cellulari tumorali discreti e spazialmente separati, la cui morfologia dipende dal sottotipo: la variante epitelioide (PDO-MPM-E) presenta strutture complesse e ramificate, mentre quella bifasica (PDO-MPM-B) mostra focolai neoplastici più compatti e dispersi nel substrato. Questa organizzazione in nuclei isolati, separati da regioni prive di cellule tumorali, richiama direttamente i *pattern a spot* prodotti dal modello a singola popolazione (2.5) per valori elevati del parametro di sensibilità all'acidosi β_t . Come nelle simulazioni, la massa neoplastica non occupa uniformemente l'intero dominio, bensì si frammenta in aggregati discreti con una spaziatura caratteristica che rispecchia la lunghezza d'onda λ_T .

Le Figure 3.15 e 3.16 illustrano una variante di confine del mesotelioma peritoneale, il mesotelioma papillare ben differenziato del peritoneo (WDPM), documentata da [9]. La Figura 3.15 offre un dettaglio morfologico delle strutture papillari che contraddistinguono questa forma: il pannello A mostra, a basso ingrandimento, innumerevoli papille distribuite sulla superficie peritoneale; i pannelli B e C ne rivelano la composizione cellulare, con foglietti piatti di cellule mesoteliali dai nuclei uniformi e papille dal profilo delicato ma regolarmente spaziate; il pannello D fornisce un dettaglio ad alto ingrandimento delle singole cellule. La

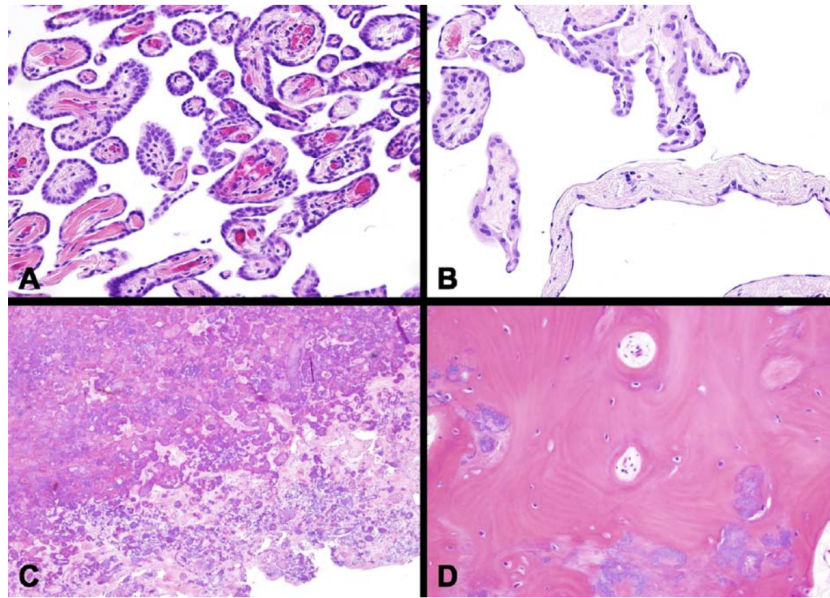


Figura 3.16: Architettura su scala tissutale del mesotelioma papillare ben differenziato del peritoneo (*WDPM*). Pannello A: distribuzione generale delle papille nel tessuto. Pannello B: papille adiacenti a una cisti da inclusione. Pannello C: calcificazioni zonali nello stroma. Pannello D: metaplasia ossea all'interno delle aree di calcificazione stromale [9].

distribuzione periodica di queste strutture allungate richiama i *pattern* labirintici e filamentosi emergenti nelle simulazioni del modello in prossimità della soglia critica β_c : così come le papille si ramificano lungo la superficie peritoneale mantenendo una spaziatura regolare, i filamenti del modello si organizzano in reticoli connessi.

La Figura 3.16 completa il quadro mostrando l'architettura della stessa neoplasia su scala tissutale più ampia. Il pannello A riporta la distribuzione generale delle papille, evidenziando come gli aggregati neoplastici coesistano con lo stroma circostante in una configurazione spaziale alternata. Il pannello B affianca una regione papillare a una cisti da inclusione adiacente. La coesistenza di zone ad alta densità cellulare e zone pressoché prive di neoplasia rispecchia la morfologia a *spot* del modello competitivo (2.28), in cui le regioni di alta concentrazione di c_t corrispondono agli aggregati tumorali e i minimi di concentrazione alle zone in cui il tessuto sano c_h persiste o il substrato è libero da neoplasia. I pannelli C e D documentano la presenza di calcificazioni zonali e di metaplasia ossea nello stroma (tessuto connettivo di supporto all'organo), formazioni che testimoniano l'intensa rimodellazione del microambiente indotta dall'acidificazione cronica del tessuto, coerente con il meccanismo di retroazione pH-dipendente alla base dei modelli studiati.

Nel complesso, il confronto qualitativo, fra le immagini istologiche e i *pattern*

prodotti dai modelli, evidenzia una corrispondenza morfologica. Nel mesotelioma peritoneale diffuso, i noduli tumorali si distribuiscono nello spazio non come una massa compatta, bensì come una popolazione di aggregati disseminati sulla superficie del peritoneo, dell'omento e degli organi addominali [33]. Una fenomenologia che riflette la struttura a *spot* predetta dall'analisi di stabilità e confermata dalle simulazioni non lineari. Le strutture papillari del *WDPM*, con la loro distribuzione periodica e la spaziatura regolare, trovano invece un riscontro nelle morfologie filamentose e labirintiche emergenti in prossimità della soglia dell'instabilità. In entrambe le varianti, la morfologia a *cluster* non è il prodotto di un comportamento prescritto dalla singola cellula tumorale, ma emerge dalla competizione locale fra proliferazione, diffusione e inibizione acido-mediata: il meccanismo alla base dei modelli di reazione-diffusione analizzati in questa tesi. Il confronto presentato non costituisce una validazione quantitativa, la quale richiederebbe dati sperimentali calibrati sul sistema biologico specifico, ma offre un riscontro qualitativo a sostegno della plausibilità biologica del meccanismo proposto.

3.6 Sintesi dei Risultati

In sintesi, le simulazioni presentate confermano l'instabilità innescata dall'acidificazione del *TME* prevista dall'analisi di stabilità lineare. La presente discussione ripercorre dapprima i risultati del modello a singola popolazione (Sezione 3.3), in cui emergono distintamente i ruoli dei parametri γ_t e β_t , e poi quelli del modello competitivo a due popolazioni (Sezione 3.4).

La proliferazione γ_t , esplorata nelle Figure 3.9 e 3.10, agisce come acceleratore della dinamica: maggiore è γ_t , più rapidamente il fronte d'invasione si propaga e il *pattern* si organizza nello spazio. A γ_t molto piccoli ($\gamma_t = 5$) la dinamica reattiva è lenta e lo stato instabile si sviluppa in tempi più lunghi, mentre a γ_t elevati il sistema raggiunge la configurazione asintotica entro poche unità adimensionali τ . La proliferazione modula anche la connettività spaziale del *pattern*: a β_t vicino alla soglia critica, γ_t grandi favoriscono strutture filamentose connesse, mentre a β_t elevati il regime di macchie isolate è raggiunto indipendentemente dal valore di γ_t , segno che la morfologia asintotica è governata principalmente da β_t .

La sensibilità all'acidosi β_t , esplorata nelle Figure 3.2, 3.4, 3.5 e 3.6 a $\gamma_t = 400$ fissato, è il vero parametro di controllo della biforcazione. La condizione iniziale stocastica di Figura 3.2 mostra come la morfologia del *pattern* asintotico (filamenti $\rightarrow$ strisce transitorie $\rightarrow$ macchie) sia selezionata da β_t in modo continuo, mentre la lunghezza d'onda caratteristica rimane sostanzialmente costante e coincide con quella predetta dall'analisi lineare. In particolare, la lunghezza d'onda λ_T teorica passa da $\simeq 0.091$ a $\simeq 0.100$ tra $\beta_t = 0.50$ e $\beta_t = 1.00$, in accordo con la spaziatura osservata fra gli *spot* dei pannelli corrispondenti. Le simulazioni a neoplasia centrale (Figure 3.4, 3.5, 3.6) aggiungono l'informazione sull'evoluzione temporale: il fronte d'invasione, partendo da una massa neoplastica regolare e localizzata, si destabilizza e si frammenta in *pattern* di Turing su scale temporali tanto più brevi quanto β_t è grande, coerentemente con la crescita lineare $\tau_{\text{grow}} \sim 1/\Lambda_{\text{max}}$, che passa da $\simeq 90$ unità adimensionali, a $\beta_t = 0.41$, fino a $\simeq 1.4$, a $\beta_t = 1.00$. Il caso $\beta_t = 0.10$ (Figura 3.3), ben al di sotto della soglia $\beta_c \simeq 0.41$, funge da controllo negativo: il fronte d'invasione si propaga in modo uniforme e il sistema converge asintoticamente allo stato omogeneo, coerentemente alla predizione lineare secondo cui $\Lambda_{\text{max}} < 0$ per $\beta_t < \beta_c$. La transizione fra il regime stabile e quello instabile è quindi una vera biforcazione di Turing.

L'esperimento a condizione iniziale gaussiana di piccola ampiezza (Figura 3.8) mostra, infine, che la formazione del *pattern* è robusta rispetto alla dimensione iniziale del *cluster* cellulare. Anche partendo da un microagglomerato di concentrazione e raggio caratteristico dieci volte inferiore a quello usato negli altri esperimenti, il fronte si frammenta in *spot* con lunghezza d'onda confrontabile e spaziatura quasi uniforme. La differenza qualitativa rispetto agli agglomerati più grandi riguarda la dinamica della regione centrale: per il *cluster* piccolo, l'apoptosi acido-indotta nel

nucleo non compare nei primi istanti. Ciò accade perché la diffusione dei nutrienti attraverso il fronte sottile compensa il consumo locale. Invece, per gli agglomerati maggiormente formati la zona centrale di necrosi/ipossia compare immediatamente, in piena analogia con la fenomenologia clinica dei carcinomi solidi avascolari, in cui la massa tumorale è troppo spessa perché l'ossigeno e i nutrienti diffondano fino al nucleo più velocemente della proliferazione cellulare incontrollata.

I risultati di Sezione 3.3 dimostrano dunque che il modello a singola popolazione cattura simultaneamente tre fenomeni qualitativi indipendenti sperimentalmente osservati: la formazione spontanea di cluster cellulari a partire da una distribuzione uniforme o localizzata; la selezione morfologica dipendente dal fenotipo aggressivo (sensibilità all'acidosi β_t); la zona di necrosi centrale che precede la frammentazione del fronte d'invasione. La concordanza quantitativa tra le lunghezze d'onda predette dall'analisi lineare e quelle osservate nelle simulazioni non lineari fornisce un'ulteriore validazione *a posteriori* della procedura di calibrazione adottata in Sezione 3.2.

Le simulazioni del modello a due popolazioni, raccolte nella Sezione 3.4, estendono questo quadro al caso competitivo, in cui le cellule tumorali c_t competono durante il transitorio con il tessuto sano c_h per lo spazio e per i nutrienti. L'analisi conferma che il meccanismo di Turing previsto dall'analisi di stabilità lineare di Sezione 2.4.2 sopravvive all'introduzione della seconda popolazione: lo stato omogeneo, perturbato stocasticamente, si destabilizza e la massa neoplastica si organizza spontaneamente in *cluster* discreti. La competizione con il tessuto sano introduce però un effetto nuovo, ovvero un marcato rallentamento della dinamica. La configurazione asintotica viene raggiunta su scale temporali assai più lunghe che nel modello a singola popolazione, fino a $\tau \simeq 1500$ in prossimità della soglia, poiché la presenza delle cellule sane sottrae risorse al fronte di invasione e ne ostacola la frammentazione.

Anche nel caso competitivo i due parametri β_t e γ_t conservano i ruoli distinti già individuati per il modello a singola popolazione. La sensibilità all'acidosi β_t governa la morfologia asintotica, con la consueta transizione continua da strutture labirintiche connesse, in prossimità della soglia, a reticoli di *spot* sempre più fitti e, infine, a macchie circolari isolate su fondo prossimo allo zero, come illustrato in Figura 3.11. La proliferazione γ_t agisce da acceleratore della dinamica e da amplificatore della connettività spaziale: a β_t fissato, il confronto a coppie di Figura 3.12 mostra che un fenotipo più aggressivo frammenta la massa tumorale in un numero molto maggiore di *spot*, più piccoli e ravvicinati, occupando il dominio in modo capillare e prevalendo sul tessuto sano, anche alle sensibilità all'acidosi più elevate.

Il modello a due popolazioni mette inoltre in luce un regime assente nel caso a singola popolazione. Quando la sensibilità all'acidosi è minima e la proliferazione è elevata, ovvero per $\beta_t = 0.17$ e $\gamma_t = 50$, l'instabilità di Turing non riesce a

strutturare lo spazio e il sistema collassa verso una saturazione omogenea di cellule tumorali, priva di *pattern*. Questo scenario delimita il confine inferiore della finestra di instabilità nel piano dei parametri e conferma che la formazione di *cluster* richiede un microambiente sufficientemente acido.

L'effetto della legge di crescita è stato infine indagato confrontando l'esponente quadratico $\varphi_1 = 2$ con quello sub-quadratico $\varphi_2 = 5/4$, ritenuto più aderente ai dati sperimentali sulla proliferazione neoplastica. Le tendenze qualitative si conservano, ma la crescita sub-quadratica, meno esplosiva, mantiene la massa tumorale più coesa: i *pattern* di Figura 3.13 preservano una marcata organizzazione radiale, con gli *spot* disposti in anelli concentrici attorno all'aggregato iniziale, e la frammentazione del fronte procede in modo più graduale e ordinato. La morfologia finale resta comunque governata da β_t , a conferma della robustezza del meccanismo rispetto alla forma del termine di proliferazione.

Trattandosi di simulazioni di una dinamica *in vitro*, ovvero di un sistema chiuso privo di rigenerazione del tessuto sano, l'esito asintotico della competizione è in tutti i casi la sostituzione completa delle cellule sane da parte della massa tumorale. Ciò che il modello a due popolazioni aggiunge al quadro complessivo non è l'esito della competizione, bensì la descrizione di come l'aggressività del fenotipo e la sensibilità all'acidosi modellino la morfologia e la scala temporale dell'invasione, in coerenza con la fenomenologia dei carcinomi che invadono e sostituiscono progressivamente il tessuto circostante.

Capitolo 4

Conclusioni

In questo lavoro di tesi si è studiato, mediante modelli di reazione–diffusione, come l’interazione tra il metabolismo delle cellule tumorali e l’acidificazione del microambiente possa guidare l’insorgenza e l’organizzazione spaziale di *cluster* di cellule neoplastiche. La trattazione si è articolata su due modelli di crescente complessità: un primo modello a singola popolazione di cellule tumorali e una sua estensione competitiva a due popolazioni, sane contro tumorali. Per entrambi il percorso seguito ha attraversato tre fasi: la formulazione del modello matematico a partire da una motivazione biologica e da un’analogia con i sistemi ecologici; l’analisi di stabilità lineare, condotta per identificare le condizioni di emergenza dei *pattern*; la validazione numerica mediante simulazioni in ambiente COMSOL Multiphysics®. In questo capitolo, si riassumono i risultati ottenuti, se ne discute l’interpretazione biologica, se ne riconoscono i limiti e si delineano i possibili sviluppi futuri.

4.1 Sintesi del Lavoro

Il punto di partenza, esposto nel Capitolo 1, è che la massa tumorale non è un sistema passivo, ma un ecosistema capace di rimodellare attivamente il proprio microambiente. L’effetto Warburg, con la conseguente produzione di lattato (ioni H^+), acidifica il *Tumor Micro-Environment* e, secondo l’ipotesi dell’invasione mediata dall’acidità di Gatenby e Gawlinski [3], conferisce alle cellule neoplastiche un vantaggio competitivo selettivo. È proprio questo *feedback* negativo mediato dal microambiente a costituire il motore della dinamica che si è indagata.

Su questa base biologica, nel Capitolo 2 si è formulato un modello di reazione–diffusione a tre equazioni (sistema 2.3) per la densità di cellule tumorali C , la concentrazione di nutrienti N e quella di ioni H^+ . La struttura del modello, in particolare la dipendenza quadratica della proliferazione e del consumo di nutrienti dalla densità cellulare, è stata mutuata dal modello di formazione di *pattern* di

vegetazione di Marasco et al. [18], sulla base di un'analogia funzionale tra la tossicità del suolo in ecologia e l'acidosi nel microambiente tumorale. Il sistema fisico è stato reso adimensionale (sistema 2.5), riducendo i parametri liberi a sei gruppi adimensionali e identificando la sensibilità all'acidosi β_t e la proliferazione cellulare γ_t come parametri di interesse principale.

A partire dal medesimo nocciolo, sempre nel Capitolo 2, si è formulato un secondo modello a quattro equazioni (sistema 2.4), che affianca alla popolazione tumorale C_T una popolazione di cellule sane C_H , in competizione per lo spazio e per i nutrienti. Rispetto al modello a singola popolazione, esso introduce un tasso di transizione fenotipica dalle cellule sane a quelle tumorali, un termine di morte per contatto fra le due specie e contempla la possibilità di esponenti di proliferazione differenti per i due fenotipi. Anche questo sistema è stato reso adimensionale (sistema 2.28), riconducendo il problema fisico a un insieme ristretto di gruppi adimensionali.

L'analisi di stabilità lineare del modello a singola popolazione (Sezione 2.3.2) ha individuato i tre equilibri omogenei del sistema e, mediante i criteri di Routh–Hurwitz applicati al polinomio caratteristico della matrice delle perturbazioni spaziali, ha identificato le condizioni di insorgenza dell'instabilità di Turing. Poiché la verifica analitica delle disuguaglianze risultava proibitiva, a causa della complessità delle espressioni dei coefficienti valutati negli equilibri, l'indagine è proseguita per via numerica. Per il *set* di parametri calibrato in Sezione 3.2, si è individuata una soglia di Turing $\beta_c \simeq 0.405$ nel parametro di sensibilità all'acidosi: al di sopra di tale soglia il sistema ammette una finestra di numeri d'onda instabili e, quindi, la possibilità di formare *pattern* spaziali.

La medesima procedura è stata applicata al modello a due popolazioni nella Sezione 2.4.2. La maggiore dimensione del sistema conduce a un polinomio caratteristico di quarto grado, ai cui coefficienti si sono applicati i criteri di Routh–Hurwitz nella loro forma estesa. Anche in questo caso la verifica analitica si è rivelata proibitiva e l'indagine è proseguita per via numerica, individuando, sull'equilibrio di sole cellule tumorali, attrattore asintotico del sistema nel regime *in vitro* considerato, l'insorgenza dell'instabilità di Turing per una sensibilità all'acidosi $\beta_t \gtrsim 0.17$ e per un intervallo intermedio di valori della proliferazione tumorale.

Le simulazioni numeriche del Capitolo 3, condotte in COMSOL Multiphysics® su un dominio bidimensionale con condizioni al bordo di flusso nullo, hanno confermato e specificato in modo quantitativo il meccanismo previsto dall'analisi lineare. Le simulazioni del modello a singola popolazione (Sezione 3.3) hanno evidenziato i ruoli distinti e complementari dei due parametri γ_t e β , mentre quelle del modello a due popolazioni (Sezione 3.4) hanno mostrato come la competizione con il tessuto sano modifichi la dinamica di invasione, rallentandola e arricchendone la fenomenologia.

4.2 Discussione e Interpretazione Biologica

I risultati numerici del Capitolo 3 permettono di trarre alcune conclusioni sul comportamento dei modelli e sul loro significato biologico. Si discutono dapprima i risultati del modello a singola popolazione (Sezione 3.3) e successivamente quelli del modello competitivo a due popolazioni (Sezione 3.4).

In primo luogo, il modello a singola popolazione è in grado di generare spontaneamente *cluster* di cellule tumorali a partire sia da una distribuzione spazialmente uniforme perturbata stocasticamente, sia da una neoplasia localizzata. Questo risultato conferma che il *feedback* negativo mediato dall'acidità in presenza di diffusioni diverse tra le specie sono sufficienti a rompere la simmetria spaziale dello stato omogeneo. L'acidificazione del microambiente non è, quindi, un semplice effetto collaterale del metabolismo tumorale, ma un meccanismo capace di organizzare la massa neoplastica in aggregati discreti.

In secondo luogo, l'analisi ha messo in luce che i due parametri biologici del modello svolgono ruoli qualitativamente differenti. La sensibilità all'acidosi β_t agisce come vero parametro di controllo della biforcazione: oltre a determinare l'esistenza stessa dell'instabilità, ne seleziona la morfologia asintotica, con una transizione continua da filamenti labirintici, vicino alla soglia, a macchie circolari isolate, per valori elevati. La proliferazione cellulare γ_t , invece, agisce come acceleratore della dinamica, modulandone la velocità e la connettività spaziale transitoria, senza alterare il regime morfologico finale, che resta governato da β_t . Questa distinzione è biologicamente significativa, poiché collega un parametro misurabile, la sensibilità del fenotipo cellulare all'acidosi, al regime di organizzazione spaziale osservato, fornendo una possibile chiave di lettura teorica per l'eterogeneità morfologica dei *pattern* di crescita riscontrati clinicamente.

In terzo luogo, le simulazioni hanno mostrato una concordanza quantitativa tra la lunghezza d'onda di Turing predetta dall'analisi lineare e la spaziatura caratteristica osservata nelle simulazioni non lineari, concordanza che rimane sostanzialmente stabile al variare di β_t . Ciò fornisce una validazione *a posteriori* della procedura di calibrazione adottata e conferma che la scala spaziale del *pattern* è una proprietà intrinseca del sistema, fissata dai rapporti di diffusione e dai tassi di reazione, e non un artefatto della condizione iniziale o della discretizzazione numerica.

Infine, le simulazioni a partire da una neoplasia localizzata hanno riprodotto un elemento di plausibilità biologica rilevante: la comparsa di una zona centrale di bassa densità cellulare, compatibile con la necrosi e l'ipossia osservate nei carcinomi solidi avascolari o poco ossigenati, che precede la frammentazione del fronte d'invasione. Il confronto tra agglomerati di diversa dimensione iniziale ha inoltre mostrato che la formazione del *pattern* è robusta rispetto alla scala dell'agglomerato di partenza, mentre la dinamica della regione centrale dipende

dallo spessore del fronte, coerentemente con il bilancio locale tra diffusione e consumo dei nutrienti.

Nel complesso, il modello a singola popolazione cattura simultaneamente tre fenomeni qualitativi osservati nella fenomenologia tumorale: la formazione spontanea di *cluster* cellulari, la selezione morfologica dipendente dall'aggressività del fenotipo e la comparsa di una zona necrotica centrale, anticipata rispetto alla frammentazione del fronte.

Il modello a due popolazioni, studiato nella Sezione 3.4, conferma e completa questo quadro. La presenza esplicita del tessuto sano in competizione non sopprime il meccanismo di Turing, ma ne rallenta sensibilmente la dinamica, sottraendo spazio e risorse alle cellule sane e ritardando la destabilizzazione del fronte di invasione e le scale temporali con cui il *pattern* si organizza. La transizione morfologica governata dalla sensibilità all'acidosi, da strutture labirintiche connesse a macchie isolate, si conserva anche nel caso competitivo, a riprova della robustezza del meccanismo rispetto all'aggiunta della seconda popolazione.

L'estensione a due popolazioni ha inoltre messo in luce un regime privo di *pattern*, assente nel modello a singola popolazione: quando la sensibilità all'acidosi è minima e la proliferazione è elevata, l'instabilità non riesce ad emergere e la massa tumorale satura il dominio in modo omogeneo. Questo scenario delimita il confine inferiore della finestra di instabilità e ribadisce che la formazione di *cluster* discreti richiede un microambiente sufficientemente acido. Infine, il confronto fra una legge di proliferazione quadratica e una sub-quadratica ha mostrato che la forma del termine di crescita influenza il grado di ordine e di coesione spaziale degli aggregati, ma non altera il ruolo di controllo della sensibilità all'acidosi sulla morfologia finale.

Sul piano biologico, il modello competitivo riavvicina la trattazione all'ipotesi originale dell'invasione mediata dall'acidità. La simulazione di una dinamica *in vitro* in sistema chiuso restituisce, come esito asintotico, la sostituzione completa del tessuto sano da parte della massa tumorale, mentre la sensibilità all'acidosi e l'aggressività del fenotipo determinano la morfologia e la rapidità con cui tale dinamiche evolve.

4.3 Limiti dello Studio

I risultati ottenuti vanno letti alla luce di alcune limitazioni, in parte intrinseche alle scelte di modellazione adottate.

La principale riguarda la natura dei risultati. Come anticipato in Sezione 3.2, la calibrazione dei parametri privilegia il valore predittivo qualitativo (la formazione, la geometria e la dipendenza parametrica dei *pattern*) rispetto alla riproduzione quantitativa di un *dataset* sperimentale specifico. Alcuni gruppi adimensionali, in

particolare quelli legati alla proliferazione e alla sensibilità all'acidosi, sono stati fissati in modo da collocare il sistema nella regione di instabilità di Turing, e i corrispondenti valori dimensionali sono stati ricavati per inversione. Di conseguenza, le scale spaziali e temporali ottenute hanno valore indicativo e non costituiscono una predizione quantitativa diretta del fenomeno biologico indagato.

Una seconda limitazione riguarda le ipotesi adottate per il modello a due popolazioni. Le simulazioni competitive riproducono una dinamica *in vitro*, ovvero un sistema chiuso privo di rigenerazione del tessuto sano. Di conseguenza, l'esito della dinamica è sempre la scomparsa asintotica della popolazione sana, e il modello non descrive la possibilità di una coesistenza stabile fra i due fenotipi, né l'eventuale risposta omeostatica del tessuto sano riscontrabile *in vivo*. Anche la calibrazione dei parametri propri della seconda popolazione, in particolare il tasso di transizione fenotipica e il coefficiente di competizione fra le cellule, è stata condotta con finalità qualitative, e i valori adottati conservano un carattere indicativo.

Ulteriori semplificazioni riguardano la geometria e la fisica del problema. Le simulazioni sono state condotte in un dominio bidimensionale idealizzato, con condizioni al bordo di flusso nullo che rappresentano un campione tissutale isolato; l'apporto vascolare di nutrienti e la rimozione dell'acido sono stati modellati attraverso termini omogeneizzati, senza una descrizione esplicita della rete vascolare e della sua evoluzione. Il modello, inoltre, non include gli effetti meccanici della massa tumorale sul tessuto circostante, né una descrizione esplicita del ciclo cellulare o della plasticità fenotipica, fenomeni che la letteratura riconosce come rilevanti nella progressione tumorale.

4.4 Sviluppi Futuri

I limiti appena discussi indicano altrettante direzioni di approfondimento.

Un primo sviluppo riguarda l'approfondimento del modello a due popolazioni, già introdotto in questo lavoro. La sua analisi di stabilità lineare, qui condotta per via numerica, potrebbe essere estesa a una caratterizzazione più sistematica degli equilibri di coesistenza e delle loro biforcazioni, anche al variare del tasso di transizione fenotipica e del coefficiente di competizione, riavvicinando ulteriormente la trattazione all'ipotesi originale di Gatenby e Gawlinski e ai successivi sviluppi di McGillen et al. [19]. Sarebbe inoltre di interesse superare lo schema *in vitro* di sistema chiuso, introducendo una rigenerazione del tessuto sano che consenta di indagare regimi di coesistenza stabile fra le due popolazioni e una dinamica di invasione più aderente al caso *in vivo*.

Sul piano numerico, l'estensione delle simulazioni a domini tridimensionali permetterebbe di verificare se la morfologia dei *pattern* e le scale caratteristiche identificate in due dimensioni si conservino in una geometria più realistica. Sarebbe

inoltre di interesse un confronto quantitativo sistematico tra le lunghezze d'onda e le morfologie predette dal modello e quelle osservabili in dati istologici, così da vincolare la calibrazione dei parametri e rafforzare il legame tra modello e fenomeno biologico.

Infine, sul piano della modellazione, il quadro potrebbe essere arricchito introducendo una descrizione esplicita della vascolarizzazione e della sua evoluzione, gli effetti meccanici della crescita tumorale sul tessuto circostante e una rappresentazione più dettagliata della plasticità fenotipica pH-dipendente. Ciascuna di queste aggiunte avvicinerebbe il modello alla complessità del microambiente tumorale reale, pur al costo di una maggiore complessità analitica e computazionale.

In conclusione, i modelli di reazione–diffusione studiati in questa tesi, pur nella loro relativa semplicità, mostrano come un meccanismo di *feedback* negativo mediato dall'acidità sia sufficiente a generare l'organizzazione spaziale della massa tumorale in *cluster* discreti, e forniscono un quadro interpretativo coerente in cui la sensibilità all'acidosi e la proliferazione cellulare governano, rispettivamente, la morfologia e la dinamica del fenomeno. Il passaggio dal modello a singola popolazione a quello competitivo a due popolazioni costituisce un primo avvicinamento alla complessità del microambiente tumorale reale e una base di partenza solida per le estensioni più realistiche delineate, verso una descrizione progressivamente più completa dell'insorgenza di *cluster* di cellule tumorali mediata dall'acidificazione del microambiente.

Bibliografia

- [1] C. O. Nordling. «A New Theory on the Cancer-Inducing Mechanism». In: *British Journal of Cancer* 7.1 (1953), pp. 68–72. DOI: 10.1038/bjc.1953.8. URL: <https://doi.org/10.1038/bjc.1953.8> (cit. a p. 3).
- [2] Alfred G. Knudson. «Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma». In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68.4 (1971), pp. 820–823. DOI: 10.1073/pnas.68.4.820. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820> (cit. a p. 3).
- [3] Robert A. Gatenby e Edward T. Gawlinski. «A Reaction-Diffusion Model of Cancer Invasion». In: *Cancer Research* 56.24 (1996), pp. 5745–5753. URL: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/56/24/5745> (cit. alle pp. 6, 13–15, 20, 40–42, 73).
- [4] Douglas Hanahan e Robert A Weinberg. «The hallmarks of cancer». In: *Cell* 100.1 (2000), pp. 57–70. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9 (cit. a p. 3).
- [5] James D. Murray. *Mathematical Biology: I. An Introduction*. 3^a ed. Vol. 17. Interdisciplinary Applied Mathematics. New York: Springer, 2002 (cit. alle pp. 26, 34, 35).
- [6] Robert A. Gatenby e Thomas L. Vincent. «An Evolutionary Model of Carcinogenesis». In: *Cancer Research* 63.19 (2003), pp. 6212–6220. URL: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/63/19/6212> (cit. a p. 14).
- [7] James D. Murray. *Mathematical Biology: II. Spatial Models and Biomedical Applications*. 3^a ed. Vol. 18. Interdisciplinary Applied Mathematics. New York: Springer, 2003 (cit. alle pp. 23, 25, 33, 34, 40).
- [8] Robert A. Gatenby e Robert J. Gillies. «Why do cancers have high aerobic glycolysis?» In: *Nature Reviews Cancer* 4.11 (2004), pp. 891–899. DOI: 10.1038/nrc1478. URL: <https://doi.org/10.1038/nrc1478> (cit. alle pp. 8–12, 14, 20).

-
- [9] Anna V. Hoekstra, Michael W. Riben, Michael Frumovitz, Jinsong Liu e Pedro T. Ramirez. «Well-differentiated papillary mesothelioma of the peritoneum: A pathological analysis and review of the literature». In: *Gynecologic Oncology* 98.1 (2005), pp. 161–167. DOI: 10.1016/j.ygyno.2005.03.031. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.03.031> (cit. alle pp. 67, 68).
- [10] Robert A. Gatenby, Edward T. Gawlinski, Arthur F. Gmitro, Brant Kaylor e Robert J. Gillies. «Acid-Mediated Tumor Invasion: a Multidisciplinary Study». In: *Cancer Research* 66.10 (2006), pp. 5216–5223. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4193. URL: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4193> (cit. alle pp. 6, 9, 11, 12).
- [11] Ralph J. DeBerardinis. «Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea». In: *Genetics in Medicine* 10.11 (2008), pp. 767–777. DOI: 10.1097/GIM.0b013e31818b0d9b. URL: <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31818b0d9b> (cit. a p. 10).
- [12] Chiara Marconi. «Il microambiente tumorale nei meccanismi di progressione neoplastica». Analisi del microambiente e motilità. Tesi di Dottorato. Università degli Studi di Firenze, 2008 (cit. a p. 11).
- [13] Kieran Smallbone, Robert A. Gatenby e Philip K. Maini. «Mathematical modelling of tumour acidity». In: *Journal of Theoretical Biology* 255.1 (2008). Fonte per i parametri di diffusione dell'acido e soglie di pH, pp. 106–112 (cit. alle pp. 40–42).
- [14] Rob A. Cairns, Isaac S. Harris e Tak W. Mak. «Regulation of cancer cell metabolism». In: *Nature Reviews Cancer* 11.2 (2011), pp. 85–95. DOI: 10.1038/nrc2981. URL: <https://doi.org/10.1038/nrc2981> (cit. alle pp. 7, 11).
- [15] Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg. «Hallmarks of Cancer: The Next Generation». In: *Cell* 144.5 (2011), pp. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> (cit. alle pp. 3, 6, 7, 10, 11, 20).
- [16] Jason R. Cantor e David M. Sabatini. «Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces». In: *Cancer Discovery* 2.10 (2012), pp. 881–898. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0345. URL: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0345> (cit. alle pp. 6–10, 12).
- [17] Philippe Icard e Hubert Lincet. «A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cells». In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1826.2 (2012), pp. 423–433. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.07.001. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.07.001> (cit. alle pp. 6, 7, 11).

- [18] Addolorata Marasco, Annalisa Iuorio, Fabrizio Cartení, Giuliano Bonanomi, Daniel M. Tartakovsky, Stefano Mazzoleni e Francesco Giannino. «Vegetation Pattern Formation Due to Interactions Between Water Availability and Toxicity in Plant-Soil Feedback». In: *Bulletin of Mathematical Biology* 76 (2014), pp. 2866–2883. DOI: 10.1007/s11538-014-0036-6 (cit. alle pp. 18, 40, 74).
- [19] Jessica B. McGillen, Eamonn A. Gaffney, Natasha K. Martin e Philip K. Maini. «A general reaction diffusion model of acidity in cancer invasion». In: *Journal of Mathematical Biology* 68.5 (2014), pp. 1199–1224. DOI: 10.1007/s00285-013-0665-7 (cit. alle pp. 15, 40, 77).
- [20] Maria V. Liberti e Jason W. Locasale. «The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?» In: *Trends in Biochemical Sciences* 41.3 (2016), pp. 211–218. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.12.001. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001> (cit. alle pp. 6, 10, 12).
- [21] Michelle Potter, Emma Newport e Karl J. Morten. «The Warburg effect: 80 years on». In: *Biochemical Society Transactions* 44.5 (2016), pp. 1499–1505. DOI: 10.1042/BST20160094. URL: <https://doi.org/10.1042/BST20160094> (cit. alle pp. 9, 12).
- [22] Patricia S. Steeg. «Targeting metastasis». In: *Nature Reviews Cancer* 16.4 (2016), pp. 201–218. DOI: 10.1038/nrc.2016.25. URL: <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.25> (cit. a p. 1).
- [23] Angela M. Jarrett, Ernesto A. B. F. Lima, David A. Hormuth II, Matthew T. McKenna, Xinzeng Feng, David A. Ekrut, Anna Claudia M. Resende, Amy Brock e Thomas E. Yankeelov. «Mathematical models of tumor cell proliferation: a review of the literature». In: *Expert Review of Anticancer Therapy* 18.12 (2018), pp. 1271–1286. DOI: 10.1080/14737140.2018.1527689 (cit. a p. 13).
- [24] Víctor M. Pérez-García et al. «Universal scaling laws rule explosive growth in human cancers». In: *Nature Physics* 16.12 (dic. 2020), pp. 1232–1237. DOI: 10.1038/s41567-020-0978-6 (cit. alle pp. 42, 62).
- [25] Saniya Arfin, Niraj Kumar Jha, Saurabh Kumar Jha, Kavindra Kumar Kesari, Janne Ruokolainen, Shubhadeep Roychoudhury, Brijesh Rathi e Dhruv Kumar. «Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism». In: *Antioxidants* 10.5 (2021), p. 642. DOI: 10.3390/antiox10050642. URL: <https://doi.org/10.3390/antiox10050642> (cit. alle pp. 7, 12).
- [26] Karuna Ganesh e Joan Massagué. «Targeting metastatic cancer». In: *Nature Medicine* 27.1 (gen. 2021), pp. 34–44. DOI: 10.1038/s41591-020-01195-4 (cit. a p. 1).

- [27] Nikolaos Sfakianakis e Mark A. J. Chaplain. «Mathematical Modelling of Cancer Invasion: A Review». In: *Mathematics* 9.1 (2021). (Preprint/Review Article). URL: <https://www.mdpi.com/journal/mathematics> (cit. a p. 13).
- [28] Douglas Hanahan. «Hallmarks of Cancer: New Dimensions». In: *Cancer Discovery* 12.1 (2022), pp. 31–46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. URL: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059> (cit. alle pp. 4–6, 8, 10–12).
- [29] Angela Ponziano. «Sviluppo e caratterizzazione di organoidi da mesotelioma maligno della pleura: risposta terapeutica e medicina di precisione». Tesi di Laurea, A.A. 2021/2022. Tesi di laurea mag. Università Politecnica delle Marche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, 2022 (cit. alle pp. 66, 67).
- [30] David Tong. *Mathematical Biology*. University of Cambridge Part II Mathematical Tripos, lecture notes. 2023. URL: <http://www.damtp.cam.ac.uk/user/tong/mathbio.html> (cit. alle pp. 23, 25, 34).
- [31] Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM), Fondazione AIOM, Istituto Superiore di Sanità (ISS), Osservatorio Nazionale Screening (ONS) e Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica (SIAPEC-IAP). *I numeri del cancro in Italia 2025*. Finito di stampare nel dicembre 2025. Brescia: Intermedia Editore, dic. 2025, pp. 1–276 (cit. a p. 65).
- [32] Douglas Hanahan. «Hallmarks of cancer—Then and now, and beyond». In: *Cell* 189 (apr. 2026), pp. 1–24. DOI: 10.1016/j.cell.2025.12.049 (cit. alle pp. 3–5).
- [33] Qian Zhao, Kangwei Xiong, Qiaoyun Wang e Lijiu Zhang. «A case of diffuse malignant peritoneal mesothelioma: case report and literature review». In: *Irish Journal of Medical Science (1971-)* (2026). DOI: 10.1007/s11845-026-04441-9. URL: <https://doi.org/10.1007/s11845-026-04441-9> (cit. a p. 69).