

# POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria Matematica

Tesi di Laurea Magistrale

## Effetto dell'ipossia e dell'acidità su colture cellulari tumorali in vitro: Review degli esperimenti in letteratura e sviluppo del modello matematico.



### Relatori

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

*firma dei relatori*

.....  
.....  
.....

### Candidato

Domenica Neri

*firma del candidato*

.....

Anno Accademico 2022-2023

# Sommario

Il seguente lavoro di tesi si propone di sviluppare un modello matematico in grado di riprodurre la distribuzione dell'espressione del fattore inducibile da ipossia HIF1 in funzione dell'ossigeno e del pH extracellulare, sulla base di risultati sperimentali presenti in letteratura.

La tesi è suddivisa in tre capitoli. Nel primo, viene presentato il problema biologico oggetto di studio, con un focus sulla relazione tra ossigeno, pH e HIF). In particolare, vengono descritti due esperimenti condotti su linee cellulari sottoposte a specifiche condizioni ipossiche, caratterizzate da una distribuzione non uniforme di ossigeno lungo il dominio.

Nel secondo capitolo vengono presentate le equazioni di reazione-diffusione che esprimono l'evoluzione della concentrazione di ossigeno all'interno della coltura cellulare nei due set-up sperimentali presi in esame. A partire da queste, attraverso opportune tecniche di espansione asintotica, è stata ricavata la soluzione analitica per la concentrazione mediata lungo la direzione verticale, in simmetria cilindrica. Le equazioni sono poi state risolte numericamente, tramite il software Comsol Multiphysics® ed i risultati delle simulazioni sono stati comparati con i risultati analitici.

Nella prima parte del terzo capitolo, si descrive un modello matematico che riproduce la dinamica HIF1-PHD2 dipendente dall'ossigeno. Nella seconda parte, infine, si introduce, in tale dinamica, la dipendenza dal pH, con l'obiettivo di riprodurre la particolare distribuzione ad anello dell'espressione di HIF che si evidenzia negli esperimenti descritti.

# Indice

<b>1</b>	<b>Scenario biologico - La biologia della cellula in risposta alle variazioni di ossigeno e pH</b>	<b>5</b>
1.1	L'ossigeno e le risposte mediate da HIF . . . . .	5
1.2	Le variazioni di pH e la regolazione dell'espressione di HIF . . . . .	9
1.3	Esperimenti in vitro per valutare ipossia, acidità ed espressione di HIFs. . . . .	11
1.3.1	Esperimento di Honda et al.[Honda et al. [2021]] . . . . .	11
1.3.2	Esperimento di Arocena et al. [Arocena et al. [2019]] . . . . .	17
<b>2</b>	<b>Gradiente di ossigeno</b>	<b>23</b>
2.1	Modello matematico per l'evoluzione dell'ossigeno nell'Exp. I . . . . .	24
2.1.1	Soluzione in coordinate cartesiane . . . . .	24
2.1.2	Soluzione in coordinate cilindriche . . . . .	27
2.2	Modello matematico per l'evoluzione dell'ossigeno nell'Exp. II . . . . .	30
2.2.1	Soluzione in coordinate cartesiane . . . . .	31
2.2.2	Soluzione in coordinate cilindriche . . . . .	34
2.3	Soluzione tramite sviluppo asintotico . . . . .	37
2.3.1	Condizione di assorbimento . . . . .	42
2.4	Simulazioni numeriche . . . . .	43
2.4.1	Simulazioni numeriche Exp.I [Honda et al. [2021]] . . . . .	44
2.4.2	Simulazioni numeriche Exp.II [Arocena et al. [2019]] . . . . .	45
<b>3</b>	<b>Dinamica HIF-PHD</b>	<b>53</b>
3.1	Dinamica HIF1-PHD2 ossigeno dipendente . . . . .	54
3.1.1	Soluzione all'equilibrio . . . . .	57
3.2	HIF1 e la dipendenza dal pH . . . . .	58
3.2.1	Simulazioni numeriche . . . . .	64



# Capitolo 1

## Scenario biologico - La biologia della cellula in risposta alle variazioni di ossigeno e pH

### 1.1 L'ossigeno e le risposte mediate da HIF

L'ossigeno è un elemento essenziale per la vita cellulare degli esseri umani. Rappresenta infatti il principale metabolita utilizzato per la produzione di ATP, la cui fosforilazione fornisce l'energia fondamentale per lo svolgimento di numerose funzioni cellulari. Tra queste, la trascrizione genica, in cui l'ATP è necessaria per il rimodellamento della cromatina, e la regolazione della dinamica citoscheletrica essenziale per il corretto svolgimento del ciclo cellulare e per la motilità cellulare.

Esistono delle situazioni in cui la quantità di ossigeno disponibile diminuisce; questa condizione, chiamata ipossia, rappresenta un forte stress per la cellula e di conseguenza comporta un rischio per la sua sopravvivenza e, in alcuni casi, anche dell'organismo.

L'ipossia può comparire in diverse situazioni ed in condizioni sia fisiologiche sia patologiche. Ad esempio, l'ambiente d' alta quota è caratterizzato da un progressivo decremento della pressione parziale di ossigeno e quindi ad una riduzione della disponibilità di ossigeno a livello tissutale. Anche il microambiente cellulare può diventare un ambiente ipossico, come risultato di un elevato tasso metabolico e/o alterazioni della vascolarizzazione. Inoltre, l'ipossia a livello cellulare accomuna condizioni patologiche che presentano eziologie diverse, come nel caso delle cellule tumorali e degli adipociti dei pazienti con obesità.

Le cellule che si riscontrano nel tessuto adiposo di pazienti obesi presentano un volume cellulare aumentato che si traduce in un aumento funzionale che non viene però sostenuto da un' aumentata vascolarizzazione: in queste condizioni il tessuto quindi risente facilmente di un insufficiente apporto di ossigeno, con la creazione di zone ipossiche [Trayhurn [2013]]. Inoltre, l'ipossia in questi casi esacerba lo stato infiammatorio che caratterizza questa condizione, sostenendo l'instaurarsi di uno stato infiammatorio cronico.

Nel caso invece dei tumori, lo stato ipossico spesso persiste anche in seguito alla formazione patologica di nuovi vasi, tramite angiogenesi. Infatti i vasi così formati presentano diverse caratteristiche che li rendono disfunzionali (disomogeneità geometriche, tortuosità, mancanza di gerarchia, alterata permeabilità) o comunque non idonei a sostenere le aumentate richieste metaboliche da parte delle cellule tumorali. Come nel caso degli adipociti dei pazienti obesi, anche in questo caso l'ipossia può complicare il quadro patologico, giocando un ruolo cruciale nella progressione tumorale.

Parlando nello specifico dei tumori, vi sono spesso diverse concause che portano all'insorgenza di un tumore. Il loro processo di formazione inizia quando una cellula di un tessuto non risponde più ai normali meccanismi di regolazione

della crescita a causa di modificazioni che possono derivare da stimoli nocivi esogeni (fumo di sigaretta, alcol, eccessiva esposizione ai raggi UV) o endogeni, per predisposizione genica; l'alterata regolazione può quindi esitare in una crescita incontrollata e dunque ad un aumento del tasso proliferativo (iperplasia), che tuttavia rappresenta un processo ancora reversibile. La persistenza dello stimolo nocivo facilita l'acquisizione di ulteriori alterazioni geniche, che predisporranno all'insorgenza di un tumore *in situ*: il tumore è ben circoscritto e spesso limitato dalla membrana basale, barriera che impedisce l'invasione di tali cellule nell'ambiente circostante.

Durante la fase iniziale, il tumore acquisisce metaboliti come l'ossigeno e il glucosio per diffusione dal tessuto circostante. Questo avviene in uno stadio di crescita avascolare, che porta ad una crescita quasi esponenziale. Tuttavia, successivamente si verifica una fase di saturazione, in cui il volume del tumore rimane per lo più costante e il suo diametro raggiunge al massimo 1 o 2 mm [Jiang et al. [2005]]. Tale dimensione è limitata dalla capacità di diffusione dei nutrienti.

Questo si traduce in marcati gradienti all'interno della massa cellulare [Mueller-Klieser [2000]], con una concentrazione sufficiente per la proliferazione e la vita cellulare solo nella parte più esterna, nota come zona proliferante. Le cellule più profonde ricevono nutrienti sufficienti solo per sopravvivere, ma non per proliferare, e pertanto si parla di zona quiescente. Le cellule nella parte più interna del tumore, invece, non ricevono abbastanza nutrienti nemmeno per sopravvivere, generando così una zona necrotica. In questa zona, le cellule morte possono subire processi di calcificazione, formando un nucleo rigido, oppure possono essere rimosse, lasciando al loro posto un "cuore liquido".

A prescindere dalla causa di ipossia, le prime risposte cellulari sono finalizzate

all'ottimizzazione del consumo di ossigeno. Questo è reso possibile dall'attivazione di una famiglia di fattori di trascrizione, denominati Fattori Inducibili dall'Ipossia (HIFs) che, grazie alla variazione di espressione di numerosi geni, permettono alla cellula di cambiare il suo assetto funzionale. I geni target codificano infatti per proteine che regolano aspetti cruciali della vita cellulare e della risposta all'ipossia, come il metabolismo, la duplicazione, la motilità, la risposta angiogenica e infiammatoria [Rexius-Hall et al. [2017]] [Eltzschig and Carmeliet [2011]]. Tali HIFs sono proteine eterodimeriche formate da due subunità: HIF $\alpha$  (che presenta tre isoforme, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , HIF3 $\alpha$ ), la cui attivazione è mediata dall'ossigeno, e HIF $\beta$ , costitutivamente attiva [Jiang et al. [1996]].

Quando i livelli di ossigeno sono normali (in condizioni di normossia), la subunità HIF $\alpha$  è degradata grazie all'azione delle proli idrossilasi (PHD1, PHD2, PHD3) [Appelhoff et al. [2004]], enzimi che catalizzano l'idrossilazione dei residui di prolina all'interno del dominio di degradazione ossigeno-dipendente (ODD) di HIF $\alpha$ . Le forme idrossilate di HIF $\alpha$  hanno grande affinità col complesso di ubiquitinazione legata al soppressore tumorale di von Hippel-Lindau (VHL); questo quindi porta alla degradazione dell'HIF $\alpha$  idrossilato nel proteasoma, un sistema intracellulare che elimina le proteine danneggiate o non più necessarie.

Le condizioni ipossiche invece sopprimono l'attività delle PHD, dunque le HIF $\alpha$  non idrossilate, non vengono degradate nel proteasoma, si accumulano nel citosol e traslocano nel nucleo dove si legano all'HIF $\beta$ , iniziando quindi la trascrizione di più di un migliaio di geni alla base dell'adattamento all'ipossia [Honda et al. [2021]].



Tra le risposte adattative, una delle più importanti e determinanti, è sicuramente quella legata al metabolismo cellulare: l'attivazione degli HIF (in particolare di HIF1) provoca il passaggio da un metabolismo aerobico, prevalentemente basato su ossigeno e glucosio, ad un metabolismo anaerobico basato soprattutto sul glucosio, che produce ATP attraverso glicolisi e fermentazione lattica. I sottoprodotti di tale metabolismo sono infatti il lattato e gli ioni  $H^+$ . Tale produzione di lattato, unita ad un inefficiente wash-out degli ioni  $H^+$  rilasciati nell'ambiente extracellulare, provoca un cambiamento del  $pH_i$  ed  $pH_e$  con un inversione del normale rapporto tra il pH intra ed extra che caratterizza le cellule in condizioni fisiologiche. Infatti, seppur da un lato viene favorita la produzione di lattato e  $H^+$ , dall'altro ne viene favorita la fuoriuscita nella matrice extracellulare grazie a trasportatori regolati dagli HIF. Di conseguenza, il  $pH_i$  tenderà verso un valore maggiormente alcalino a discapito di quello extracellulare che arriverà a valori acidi, spesso inferiori a 6.8 [Corbet and Feron [2017]].

## 1.2 Le variazioni di pH e la regolazione dell'espressione di HIF

Uno dei risultati principali dell'ipossia è un cambiamento nel metabolismo che comporta una riduzione della fosforilazione ossidativa e un aumento della glicolisi, con conseguente produzione di acido lattico [Chiche et al. [2010]]. Questo processo, combinato con altri meccanismi, porta ad un'acidificazione dell'ambiente tumorale extracellulare che ha, al pari dell'ipossia, importanti conseguenze sulla progressione e invasività tumorale [Rofstad et al. [2006]].

Le variazioni di pH, inoltre, influenzano direttamente anche l'espressione di

HIF1 $\alpha$  e HIF2 $\alpha$  in una maniera PHD/VHL-indipendente, che passa attraverso la regolazione della proteina chaperone HSP90 (Heat Shock Protein 90). [Filitova et al. [2016]].

In tale studio, una serie di linee cellulari di glioblastoma (G55TL, G121, G141, and G142) è stata sottoposta a diversi trattamenti con lo scopo di abbassare il pH. I risultati hanno dimostrato che un pH mediamente acido e l'ipossia aumentano in modo sinergico la risposta di HIF. Infatti, un pH mediamente acido è sufficiente per sovraesprimere i livelli di HIF $\alpha$  già in condizioni di normossia, aumentando ulteriormente l'espressione di HIF $\alpha$  in condizioni di ipossia. Questo potenzia ulteriormente l'aumento dipendente dall'ipossia nell'espressione di HIF $\alpha$ .

L'aspetto interessante è che abbassando il pH fino a 6.6-6.8, condizioni che si osservano nei tumori, l'espressione di HIF $\alpha$  è indotta in modo efficiente in condizioni di normossia e ipossia, mentre un'ulteriore riduzione del pH riduce l'espressione di HIF $\alpha$ .

Il meccanismo molecolare è legato alla proteina chaperone HSP90. Le proteine chaperone aiutano a preservare la funzionalità dei fattori di trascrizione, come HIF, in condizioni di pericolo per la cellula: in questo caso HSP90 agisce in risposta a condizioni di aumentata acidità proteggendo HIF $\alpha$  dalla degradazione. In condizioni fisiologiche, l'azione della HSP90 viene contrastata da parte di RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1). Questo può indebolire la protezione di HSP90 su HIF $\alpha$  e rendere più probabile la sua degradazione da parte del proteasoma.

In questo modo, l'acidosi può indirettamente influire sulla regolazione degli HIF e potenzialmente influire sulla trascrizione di geni specifici che sono regolati da

HIFs, come quelli che codificano per la produzione di emoglobina o l'angiogenesi.

Nonostante la loro importanza, la comprensione completa dell'interazione tra ipossia tumorale e acidosi nella progressione del tumore è ancora limitata e richiede ulteriori studi e ricerche.

### **1.3 Esperimenti in vitro per valutare ipossia, acidità ed espressione di HIFs.**

Esistono diversi lavori che cercano di riprodurre in vitro l'alterata distribuzione di  $O_2$  che caratterizza il microambiente tumorale: tra questi si analizzano nello specifico il lavoro svolto da Honda et al [Honda et al. [2021]] e quello condotto da Arocena et al [Arocena et al. [2019]].

#### **1.3.1 Esperimento di Honda et al.[Honda et al. [2021]]**

Honda et al. [Honda et al. [2021]] studiano la risposta di HIF1 $\alpha$  all'ipossia in una coltura di cellule tubulari renali e indagano sull'eventuale dipendenza dell'espressione dell'HIF1 $\alpha$  da fattori indipendenti dall'ossigeno.

Poiché diversi studi, ad esempio [Hirakawa et al. [2018]], confermano l'esistenza di un gradiente di ossigeno negli organi viventi, è interessante capire la risposta dell'HIF1 $\alpha$  in presenza di un gradiente di ossigeno e se questa varia rispetto ai risultati ottenuti in condizioni di perfusione omogenea [Rexius-Hall et al. [2017]]

Gli autori ricreano due diverse condizioni di ipossia, con ossigenazione omogenea e non, e dimostrano importanti differenze nell'espressione di HIF1 $\alpha$  nei due casi. Per riprodurre un modello di ipoperfusione con gradiente di ossigeno,

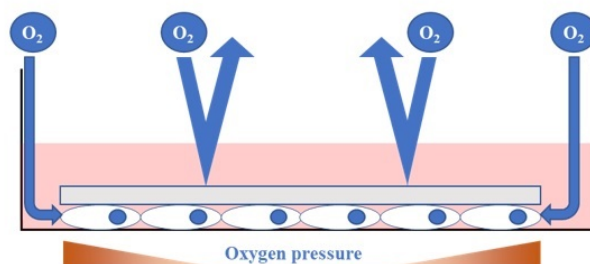


Figura 1.1: Schema del modello di ipoperfusione usato da Honda et al. [Honda et al. [2021]].

mostrato in Figura 1.1, si è utilizzato un vetrino circolare di 15 mm. Nello specifico, esistono due diversi metodi: il primo, quello tradizionale, consiste nel posizionare tale vetrino sullo strato di cellule in coltura a confluenza del 100% sul fondo di un piatto di 27 mm. Nel secondo, quello alternativo, le cellule vengono inizialmente portate a confluenza del 100% su un vetrino dentro un piatto di 35 mm e il giorno successivo tale vetrino viene invertito così che le cellule vengono posizionate sul fondo di un nuovo disco di 27 mm. Tra i due, si preferisce quest'ultimo metodo perché con quello tradizionale la maggior parte delle cellule si distacca dal fondo del disco durante la rimozione del vetrino. I due diversi metodi vengono mostrati in Figura 1.2.

Dagli esperimenti condotti si conferma che questo modello di ipoperfusione è efficace per la formazione di un gradiente di ossigeno. Si osserva infatti una vasta area ipossica al centro del vetrino ma non in prossimità del bordo. In particolare, la pressione dell'ossigeno decresce all'aumentare della distanza dal bordo del vetrino. Dopo circa 10 minuti dal posizionamento del vetrino, il gradiente, mostrato in Figura 1.3, raggiunge uno stato stazionario.

L'aspetto interessante di tale modello è la distribuzione particolare di HIF1 $\alpha$ .

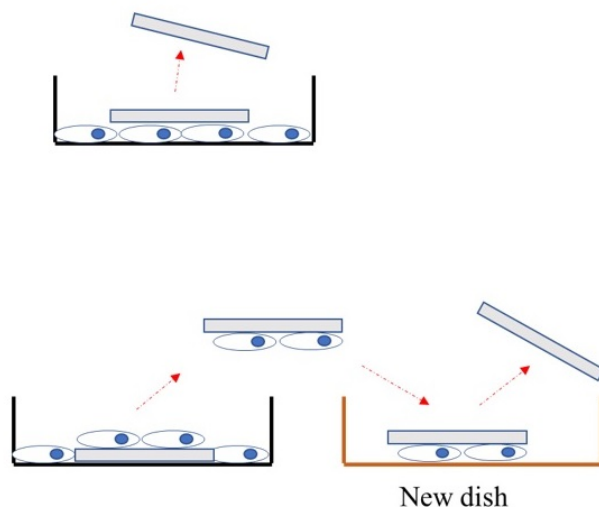


Figura 1.2: **Due diversi metodi di formazione del modello di ipoperfusione.** In alto il metodo tradizionale. In basso il metodo alternativo [Honda et al. [2021]].

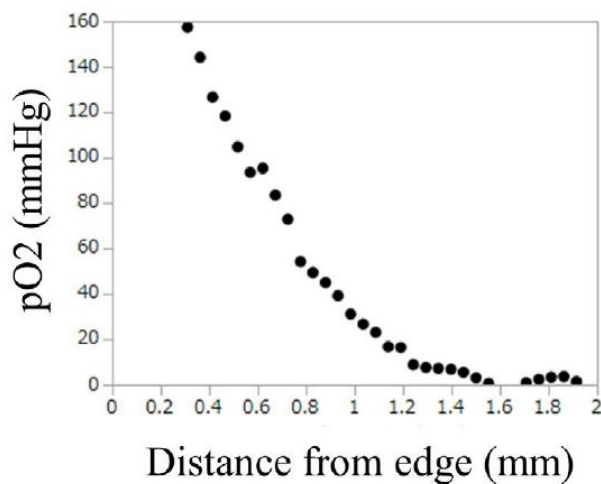


Figura 1.3: Dati sperimentali del gradiente di ossigeno che si forma dopo 10 minuti circa dal posizionamento del vetrino [Honda et al. [2021]].

Per determinare il fenomeno che provoca un accumulo di HIF1 $\alpha$  sul bordo del vetrino, Honda et al [Honda et al. [2021]] hanno effettuato una serie di esperimenti in condizioni di tensione di ossigeno omogenea. Da questi si evidenzia un

aumento dell'accumulo di HIF1 $\alpha$  in condizioni ipossiche ( 1% O<sub>2</sub>), e soprattutto durante l'incubazione anossica su tutta la zona del vetrino. Dunque, quello che ci si aspetterebbe in presenza di un gradiente di ossigeno è che l'HIF1 $\alpha$  aumenti all'aumentare della distanza dalla fonte di ossigeno e presenti un'espressione massima nella parte anossica.

In realtà il risultato degli esperimenti con gradiente di ossigeno mostra una distribuzione dell'HIF1 $\alpha$  diversa: dalle immagini ottenute mediante l'immunostochimica (ICC), mostrate in figura 1.4, si nota che l'espressione di HIF1 $\alpha$  è massima ad una certa distanza dal bordo dell'aggregato, in corrispondenza del bordo dell'area caratterizzata da ipossia formando un cerchio ("HIF ring"). Tale anello inizia a formarsi dopo circa 1 ora dal posizionamento del vetrino e appare statico dopo circa 3 ore. Dunque questi risultati suggeriscono che la particolare distribuzione ad anello di HIF è determinata da un fattore diverso dalla tensione di ossigeno.

In un primo momento Honda et al. hanno indagato su una possibile sovraregolazione della degradazione dell'HIF1 $\alpha$  all'interno dell'anello, che appare improbabile vista la presenza della zona anossica e la dipendenza dell'attività catalitica della PHD dall'ossigeno. A seguito di esperimenti in cui, o si stabilizza la degradazione dell'HIF tramite cloruro di cobalto, o si riduce l'espressione della PHD, sono arrivati alla conclusione che la degradazione dell'HIF tramite PHD non è correlata alla formazione dell'anello.

Successivamente, studiando il pH intracellulare, sono arrivati alla scoperta dell'esistenza di un gradiente di pH all'interno del campione; infatti esso decresce sulla maggior parte dell'area interna, ma non vicino al bordo del vetrino. Inoltre, osservando l'anello di HIF per vari valori di pH<sub>i</sub>, si nota che, per valori di pH<sub>i</sub> tra 8.5 e 7.4, l'anello è chiaramente visibile, mentre per pH<sub>i</sub> pari a 6.5 è

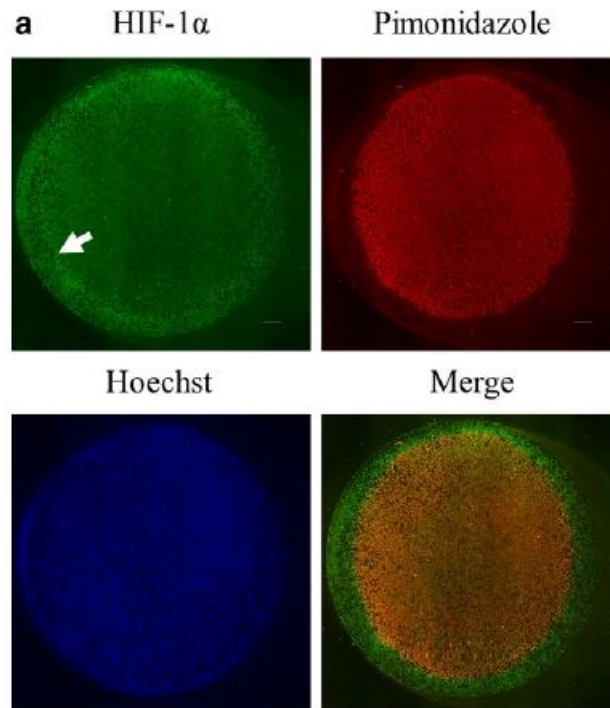


Figura 1.4: **Distribuzione di  $HIF1\alpha$  nel modello di ipoperfusione.** Immunocitochimica di  $HIF1\alpha$  di cellule HK-2 $\alpha$  coperte con un vetrino rotondo da 15 mm per 3 ore, con pimonidazolo come mezzo di contrasto.  $HIF1\alpha$  ha mostrato una formazione a forma di ciambella sul bordo dell'area pimonidazolo-positiva (freccia)[Honda et al. [2021]]

leggermente oscurato. Inoltre il segnale di  $HIF1\alpha$  è attenuato nell'intera area del vetrino per un  $pH_i$  pari a 5.0. Questo conferma che la posizione dell'anello varia in maniera dipendente dal  $pH_i$ .

A seguito di tali scoperte, all'interno di tale articolo propongono il seguente meccanismo di formazione dell'anello al decrescere della tensione di ossigeno e al variare del pH mostrato in Figura 1.5: il posizionamento del vetrino sul campione induce la formazione di un gradiente di ossigeno, ma anche di un gradiente di pH; sebbene  $HIF1\alpha$  si accumuli al decrescere dell'ossigeno, tale

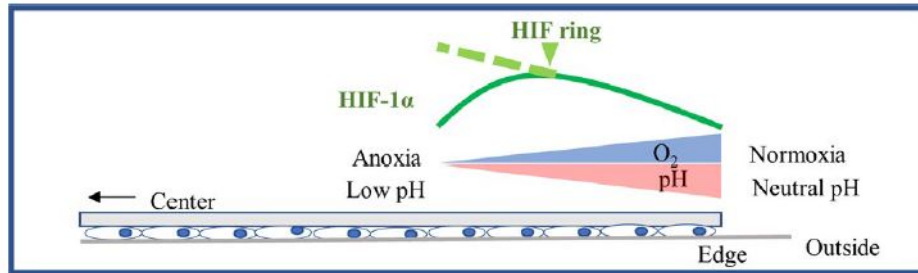


Figura 1.5: **Possibile meccanismo di formazione dell'anello di espressione di HIF1.** C'è un gradiente di pH e un gradiente di ossigeno sul bordo del vetrino nel modello di ipoperfusione, indotto dal posizionamento del vetrino. Sebbene l'HIF1 $\alpha$  si accumuli al diminuire della pressione dell'ossigeno, tale accumulo viene soppresso a causa del basso pH entro una certa distanza dal bordo del vetrino [Honda et al. [2021].

accumulo è soppresso a causa di un basso pH ( $\text{pH}_i = 5.0$ ) entro una certa distanza dal bordo del vetrino.

È importante fare una precisazione legata al tipo di cellule utilizzate nell'esperimento. Sono state usate infatti, principalmente cellule HK-2, cioè cellule umane renali: le cellule renali sono continuamente esposte ad un ambiente molto acido, quindi il comportamento cellulare indotto dall'esposizione a particolari livelli di pH potrebbe non essere riproducibile agli stessi livelli in un'altra linea cellulare.

Oltre alle cellule renali, sono state utilizzate cellule HeLa, una linea di cellule tumorali della cervice uterina, estremamente resistenti e in grado di moltiplicarsi in maniera indefinita. Tuttavia i risultati mostrati per queste linee cellulari sono parziali a causa di difficoltà tecniche di adesione al vetrino. Nel complesso viene però riportato un comportamento simile a quelle renali con la formazione, anche in questo caso dell'anello di espressione di HIF1 $\alpha$  che si può vedere in Figura 1.6.



### 1.3.2 **Esperimento di Arocena et al.** [[Arocena et al. \[2019\]](#)]

Il secondo lavoro citato utilizza solo cellule tumorali ed ha come obiettivo quello di ricreare una condizione sperimentale simile al microambiente che caratterizza la fase avascolare del tumore nelle sue prime fasi di sviluppo. A tal fine, apportano delle modifiche al modello di ipossia indotta dall'utilizzo del vetrino.

La prima modifica consiste nell'aumentare lo spazio tra il vetrino e le cellule con lo scopo di ridurre al minimo gli effetti causati da un volume medio ridotto. L'altra modifica consiste nel porre un foro al centro del vetrino superiore che diventerà l'unica fonte di ossigeno per le cellule. In questo scenario il foro centrale simula la presenza di un vaso sanguigno, fonte di ossigeno, e mano a mano che la distanza dal foro/vaso aumenta, la disponibilità di ossigeno per le cellule si riduce.

Per creare questa variante del modello è stato utilizzato un piatto di 20 mm di diametro profondo 1 mm. Il vetrino, quadrato, ha lato di 24 mm e spessore di 2 mm e presenta un foro quadrato al centro largo 1 mm. Poichè il vetrino è più grande, quando viene poggiato sul piatto i bordi laterali vengono sigillati non consentendo il passaggio di ossigeno, il quale arriverà esclusivamente dal foro centrale (Figura 1.7).

Per gli esperimenti sono state utilizzate colture di cellule di cancro alla prostata LNCaP le quali sono state incubate con il pimonidazolo, marcatore dell'ipossia, e con un mezzo sensibile alle variazioni di pH.

Dopo 24 ore dal posizionamento del vetrino si rileva un gradiente di intensità fluorescente che aumenta in maniera marcata nella periferia del piatto (Figura

1.8): questo conferma l'esistenza di un gradiente di ossigeno dal centro alla periferia del campione. Sempre dopo 24 ore si rileva un abbassamento di valori del pH extracellulare nelle zone periferiche, che corrispondono a quelle caratterizzate da ipossia più marcata. La relazione tra i due fenomeni va ricercata nelle conseguenze cellulari dell'attivazione dell'HIF, in particolare nel cambiamento metabolico già descritto in precedenza. Un'altra importante conseguenza osservata riguarda la morfologia mitocondriale delle cellule: essa diventa sempre più alterata all'aumentare della distanza dalla fonte di ossigeno. Nella periferia del piatto si osservano mitocondri notevolmente arrotondati e gonfi. Inoltre, se in condizioni normali di ossigeno le cellule LNCaP mostrano sporgenze relativamente quiescenti e motilità molto limitata, in condizioni ipossiche si osservano protusioni dinamiche e una migrazione cellulare notevolmente aumentata. Studi precedenti [Lehmann et al. [2017]] infatti dimostrano che l'ipossia stimola la motilità cellulare e può promuovere la diffusione metastatica.

Dunque, per riassumere, tale variante del modello che ricrea un microambiente tumorale realistico, può essere utile per studiare i legami tra l'evoluzione del tumore ed il microambiente in cui si trova.

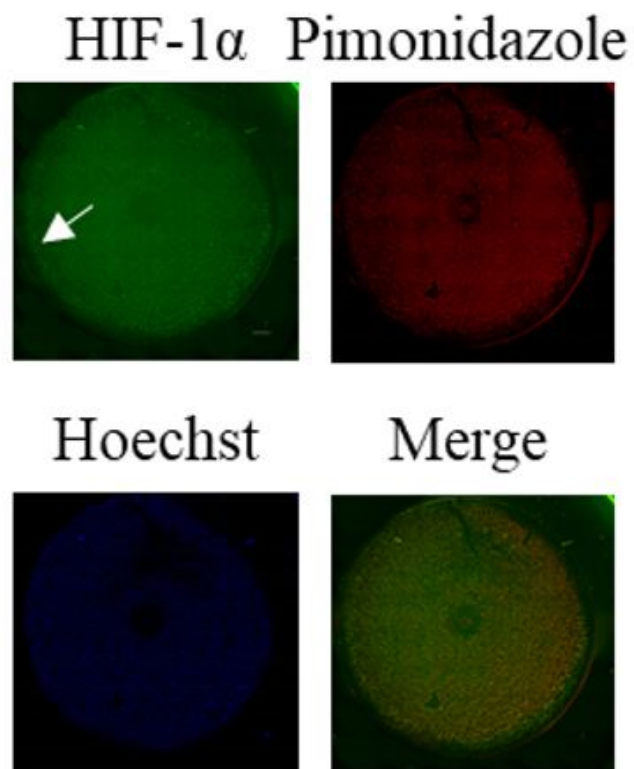


Figura 1.6: **Immunocitochimica di HIF1 $\alpha$  in cellule HeLa di cancro della cervice.** È stato osservato l'anello di HIF1 $\alpha$  più all'esterno rispetto agli esperimenti sulle linee cellulari HK-2

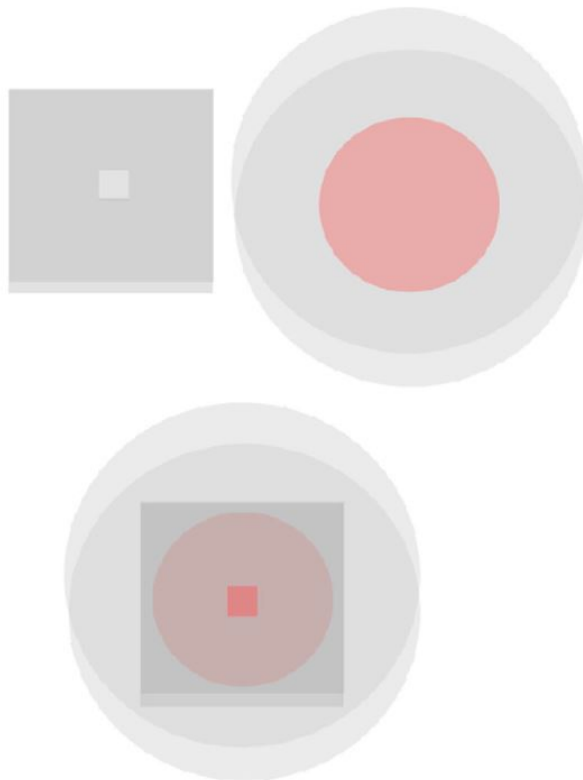


Figura 1.7: Schema del metodo utilizzato da Arocena et. al [[Arocena et al. \[2019\]](#)]

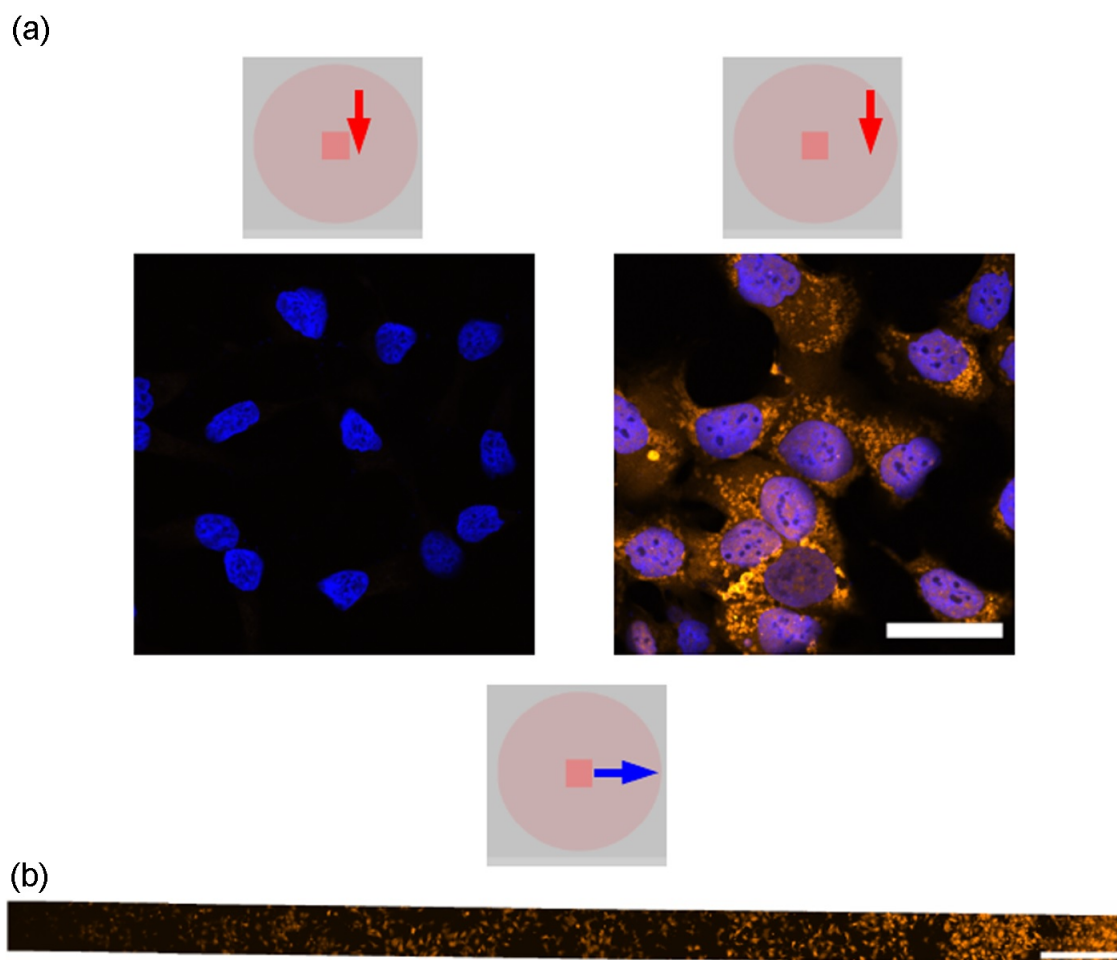


Figura 1.8: Gradiente di ossigeno, rilevabile grazie al marker di ipossia (Pimonidazole) [Arocena et al. [2019]]



## Capitolo 2

# Gradiente di ossigeno

L'obiettivo del presente capitolo è definire una soluzione analitica del gradiente di ossigeno che si forma all'interno dei provini utilizzati negli esperimenti condotti da [Honda et al. [2021]] (Exp. I) e [Arocena et al. [2019]] (Exp. II). In particolare verranno definite in un primo momento le soluzioni della concentrazione media di  $O_2$  in un dominio 2D, quindi in coordinate cartesiane. Successivamente, sfruttando la struttura a simmetrica cilindrica dei provini, si definirà la soluzione in coordinate cilindriche in un dominio 2D assialsimmetrico. A partire da queste, attraverso opportune tecniche di espansione asintotica, si ricaverà la soluzione analitica per la concentrazione mediata lungo la direzione verticale, in simmetria cilindrica.

Infine tali soluzioni saranno confrontate con i rispettivi risultati numerici delle simulazioni eseguite mediante il software agli elementi finiti Comsol Multiphysics [com].

## 2.1 Modello matematico per l'evoluzione dell'ossigeno nell'Exp. I

Per ottenere un modello matematico che riproduca le particolari condizioni di ossigeno che si evidenziano nell' Exp. I, descritte nel paragrafo 1.3.1 e riassunte brevemente in Figura 2.1, è necessario definire una funzione che modella la concentrazione di ossigeno in un dominio opportuno.

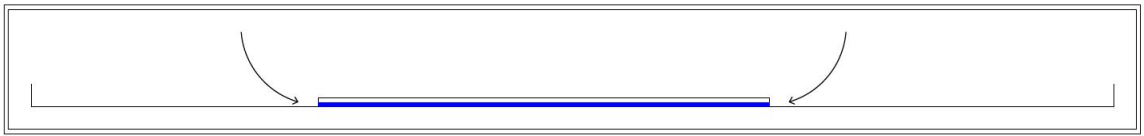


Figura 2.1: schema del provino utilizzato nell'Exp.I. Il vetrino, di lunghezza  $2L$ , è posizionato sulle cellule (in blu) che si trovano sul fondo di un pozzetto. In questo modo il passaggio dell'ossigeno è consentito solo dai bordi laterali.

### 2.1.1 Soluzione in coordinate cartesiane

In questa fase iniziale si prenderà in esame un dominio 2D, dunque si definirà una soluzione in coordinate cartesiane.

Si definisce per tale motivo una funzione  $c = c(t, x, y)$  in un dominio  $\Omega$ , definito e rappresentato in Figura 2.2, che modella la concentrazione di ossigeno nella posizione  $(x, y) \in \Omega$  al tempo  $t \geq 0$ ; si finisce inoltre  $D$ , il coefficiente di diffusione dell'ossigeno, e  $\delta$  il tasso di assorbimento dell'ossigeno da parte delle cellule.

A seguito di tali premesse, l'equazione che modella la diffusione dell'ossigeno all'interno del dominio  $\Omega$  al tempo  $t$  è:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - \delta c \quad \text{in } \Omega \quad (2.1)$$





Figura 2.2: dominio  $\Omega = [0, L] \times [0, h] \in \mathbb{R}^2$  su cui è definita la soluzione in coordinate cartesiane che modella la concentrazione di ossigeno, dove  $h = 10 \mu\text{m}$  rappresenta il diametro cellulare. Si definirà dunque la soluzione su metà dominio: il lato rosso a destra rappresenta la parte aperta del provino che consente il passaggio di ossigeno, mentre il lato di sinistra rappresenta la parte centrale del provino.

Si studierà il problema stazionario, analizzando la situazione in cui tale gradiente è già stato raggiunto e si mantiene costante nel tempo. Dunque:

$$D \nabla^2 c - \delta c = 0 \quad \text{in } \Omega \quad (2.2)$$

Esplicitando il laplaciano in coordinate cartesiane, si ha:

$$\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} - \frac{\delta}{D} c = 0 \quad \text{in } \Omega \quad (2.3)$$

Considerando adesso, la geometria del problema in esame, è lecito supporre che la soluzione rimanga costante lungo  $y$  e vari solo lungo  $x$ . Dunque, integrando tale equazione lungo l'asse  $y$ , si ottiene:

$$\frac{\partial^2 h \bar{c}}{\partial x^2} - \frac{\delta}{D} h \bar{c} = 0 \quad (2.4)$$

dove  $\bar{c}(x)$  si definisce come segue:

$$\bar{c}(x) = \frac{1}{h} \int_0^h c(x, y) dy \quad (2.5)$$

Dunque:

$$\frac{\partial^2 \bar{c}}{\partial x^2} - \frac{\delta}{D} \bar{c} = 0 \quad (2.6)$$

Questa è un'equazione differenziale ordinaria del secondo ordine, omogenea a coefficienti costanti, la cui soluzione è data dalla seguente combinazione lineare

di funzioni esponenziali:

$$\bar{c} = A_1 e^{\mu x} + B_1 e^{-\mu x} \quad (2.7)$$

dove  $\mu = \sqrt{\frac{\delta}{D}}$ , mentre le costanti  $A_1$  e  $B_1$  si possono determinare imponendo le condizioni al contorno del problema in esame.

In particolare, il sistema da risolvere per ottenere la soluzione analitica del gradiente di ossigeno che si genera nell'Exp.I è:

$$\begin{cases} \bar{c}(r = L) = c_0 \\ \frac{d\bar{c}}{dr}(r = 0) = 0 \\ \bar{c} = A_1 e^{\mu x} + B_1 e^{-\mu x} \end{cases} \quad (2.8)$$

Imponendo la condizione di Neumann (2.8)<sub>2</sub>, si ottiene:

$$A_1 \mu e^{\mu x} - B_1 \mu e^{-\mu x} |_{x=0} = 0 \quad \implies \quad B_1 = A_1 \quad (2.9)$$

Mentre, imponendo la condizione di Dirichlet (2.8)<sub>1</sub>, si ha:

$$\begin{aligned} \bar{c}(L = c_0) &\implies A_1 [e^{\mu L} + e^{-\mu L}] = c_0 \\ &\implies A_1 = \frac{c_0}{[e^{\mu L} + e^{-\mu L}]} \end{aligned} \quad (2.10)$$

Dunque, la soluzione dell'equazione di diffusione che descrive il gradiente di ossigeno all'interno del provino utilizzato in [Honda et al. \[2021\]](#), rappresentata in Figura 2.3 è:

$$\bar{c}(x) = \frac{c_0}{[e^{\mu L} + e^{-\mu L}]} [e^{\mu x} + e^{-\mu x}] \quad (2.11)$$

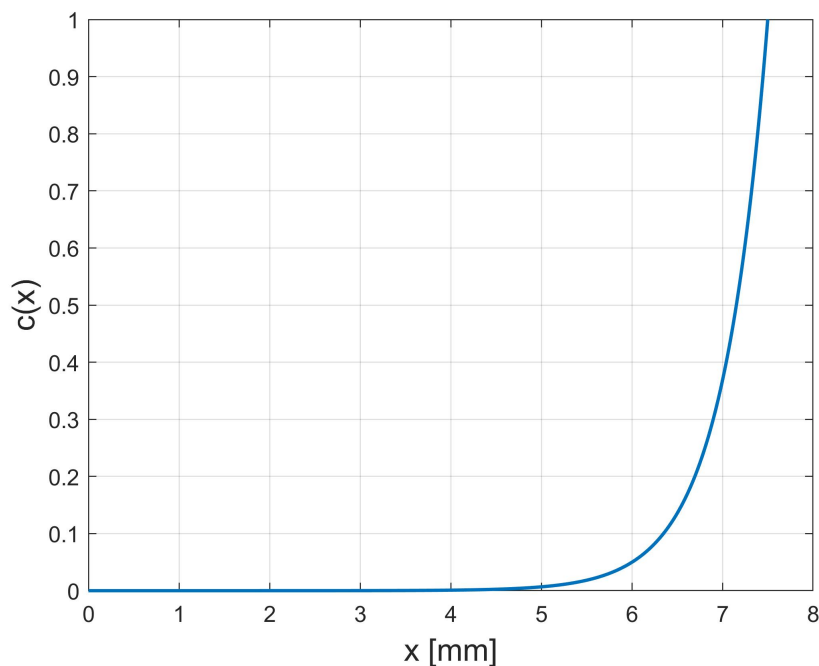


Figura 2.3: Soluzione analitica in coordinate cartesiane della concentrazione di ossigeno nell'Exp. I.

### 2.1.2 Soluzione in coordinate cilindriche

Se si considera il dominio tridimensionale del provino, questo presenta una forma cilindrica. Dunque, per ottenere una soluzione più realistica è preferibile lavorare in coordinate cilindriche su un dominio 2D assialsimmetrico (mostrato in Figura 2.4). Si definisce dunque sul dominio  $\Omega \in \mathbf{R}^2$  una funzione  $c = c(t, r, z)$  che modella la concentrazione dell'ossigeno nella posizione  $(r, z) \in \Omega$  al tempo  $t \geq 0$ ;  $D$  è il coefficiente di diffusione dell'ossigeno, mentre  $\delta$  è il tasso di assorbimento dell'ossigeno da parte delle cellule. A seguito di tali premesse, l'equazione che modella la diffusione dell'ossigeno nel tempo all'interno del dominio  $\Omega$  è:



Figura 2.4: Dominio  $\Omega = [0, R] \times [0, h]$  su cui è definita la soluzione in coordinate cilindriche che modella la concentrazione di ossigeno dell'Exp.I. Fruttando la simmetria dunque si prende in esame metà dominio: il lato tratteggiato a sinistra rappresenta l'asse di simmetria, mentre il lato rosso a destra rappresenta la parte aperta del provino che consente il passaggio di ossigeno.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - \delta c \quad \text{in } \Omega \quad (2.12)$$

Si studierà il problema stazionario, analizzando la situazione in cui il gradiente di ossigeno è già stato raggiunto e si mantiene costante nel tempo. Dunque:

$$D \nabla^2 c - \delta c = 0 \quad \text{in } \Omega \quad (2.13)$$

Esplicitando il laplaciano in coordinate cilindriche, si ha:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - \frac{\delta}{D} c = 0 \quad \text{in } \Omega \quad (2.14)$$

Anche in questo caso, considerando che  $h \ll L$ , è lecito supporre che la concentrazione di ossigeno si mantenga costante al variare di  $z$ , e che vari solo lungo  $r$ . Dunque, integrando tale equazione lungo l'asse  $z$ , si ottiene:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[ r \frac{\partial h \bar{c}}{\partial r} \right] - \frac{\delta}{D} h \bar{c} = 0 \quad (2.15)$$

dove  $\bar{c}(x)$  è definita come segue:

$$\bar{c} = c(r) = \frac{1}{h} \int_0^h c(r, z) dz \quad (2.16)$$

Sviluppando le derivate in (2.15), si ottiene:

$$\bar{c}'' + \bar{c}' - \frac{\delta}{D} r \bar{c} = 0 \quad (2.17)$$

Questa è un'equazione differenziale ordinaria del secondo ordine, omogenea a coefficienti non costanti la cui soluzione è data dalla seguente combinazione lineare [Zwillinger and Jeffrey [2007]]:

$$\bar{c} = A_1 I_0(r) + B_1 K_0(r) \quad (2.18)$$

Le costanti  $A_1$  e  $B_1$  si definiscono imponendo le condizioni al contorno del problema in esame e  $I_0$  e  $K_0$  sono le equazioni di Bessel modificate di ordine zero. Quest'ultime, in termini di serie, sono definite nel seguente modo [Abramowitz et al. [1988]]:

$$\begin{aligned} I_0 &= \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{r^{2n}}{2^{2n}(n!)^2} \\ K_0 &= -\ln\left(\frac{r}{2} + \gamma\right) I_0 + \frac{\frac{1}{4}z^2}{(1!)^2} + \left(1 + \frac{1}{2}\right) \frac{(\frac{1}{4}z^2)^2}{(2!)^2} + \dots \end{aligned} \quad (2.19)$$

In conclusione, il sistema da risolvere per ottenere la soluzione analitica della concentrazione di ossigeno nell'Exp.I in coordinate cilindriche è:

$$\begin{cases} \bar{c}(r = R) = c_0 \\ \frac{d\bar{c}}{dr}(r = 0) = 0 \\ \bar{c} = A_1 I_0(r) + B_1 K_0(r) \end{cases} \quad (2.20)$$

Imponendo la condizione di Neumann  $(2.20)_2$  si ottiene:

$$A_1 I_1(0) - B_1 K_1(0) = 0 \quad (2.21)$$

dove  $I_1$  e  $K_1$  sono le equazioni di Bessel modificate di ordine uno. Poichè  $K_1(0) \rightarrow +\infty$ , allora necessariamente  $B_1 = 0$ . Inoltre, imponendo la condizione di Dirichlet  $(2.20)_1$ , si ottiene:

$$A_1 = \frac{c_0}{I_0(R)} \quad (2.22)$$

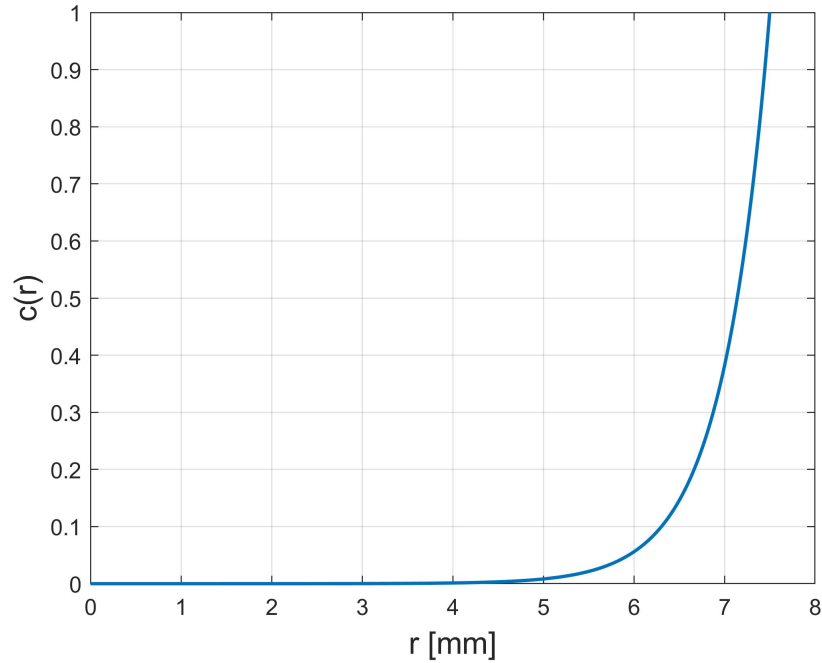


Figura 2.5: Soluzione analitica in coordinate cilindriche della concentrazione di ossigeno nell'Exp. I.

Infine, la soluzione del sistema 2.20, riportata in Figura 2.5, è:

$$c(r) = c_0 \frac{I_0(r)}{I_0(R)} \quad (2.23)$$

## 2.2 Modello matematico per l'evoluzione dell'ossigeno nell'Exp. II

In questo esperimento, come già descritto nel paragrafo 1.3.2, si ha uno strato cellulare sul fondo di un pozzetto cilindrico avente diametro di 20 mm al di sopra del quale è presente il fluido di coltura in cui si diffonde l'ossigeno. Il

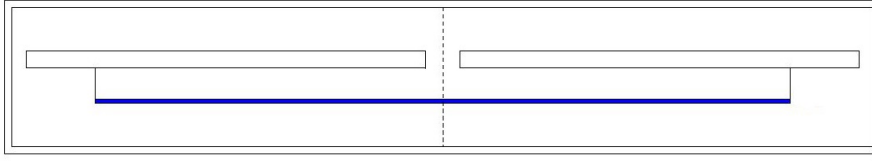


Figura 2.6: Schema del provino utilizzato nell'Exp.II. L'area blu rappresenta la zona in cui è situato lo strato cellulare.

pozzetto viene poi coperto con un vetrino che presenta al centro un foro quadrato ( di lato  $2l = 1 \text{ mm}$ ) (Figura 2.6).

Anche in questo caso si andrà a definire inizialmente una soluzione della concentrazione di ossigeno in coordinate cartesiane su un dominio 2D opportuno. Successivamente, sfruttando la struttura assialsimmetrica, si dedurrà una soluzione in coordinate cilindriche.

### 2.2.1 Soluzione in coordinate cartesiane

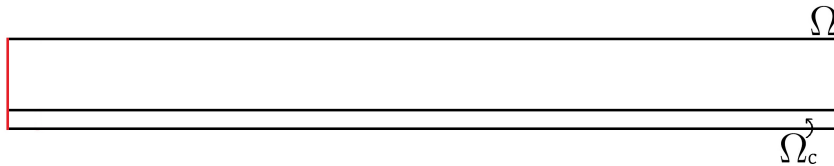


Figura 2.7: dominio  $\Omega = [0, L] \times [0, h] \in \mathbb{R}^2$  su cui è definita la soluzione che modella la concentrazione di ossigeno. Le cellule si trovano nel sottodominio  $\Omega_c \in \Omega$ , così definito:  $\Omega_c = [0, L] \times [0, \alpha h]$ . La parte in cui si trova il foro viene trascurata e si suppone che il passaggio dell'ossigeno sia consentito da tutto il lato di sinistra (in rosso).

Si definisce, sul dominio 2D mostrato in Figura 2.7, una funzione  $c = c(t, x, y)$  che modella la concentrazione di ossigeno all'interno del dominio

$\Omega$  al tempo  $t \geq 0$ , il coefficiente di diffusione dell'ossigeno  $D$  e il tasso di assorbimento dell'ossigeno  $\delta$  da parte delle cellule che si trovano all'interno del sottodominio  $\Omega_c \subset \Omega$ .

L'equazione di diffusione dell'ossigeno al tempo  $t \geq 0$  all'interno del dominio  $\Omega$  è:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - H(\Omega_c) \delta c \quad \text{in } \Omega \quad (2.24)$$

dove  $H(\Omega_c)$  è una funzione di Heaviside così definita:

$$H(\Omega_c) = \begin{cases} 1 & \text{in } \Omega_c \\ 0 & \text{altrove} \end{cases} \quad (2.25)$$

Volendo studiare, anche in questo caso, il problema stazionario, si ha:

$$D \left[ \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \right] - H(\Omega_c) \delta c = 0 \quad (2.26)$$

Integrando tale equazione lungo l'asse  $y$ , si ottiene:

$$\int_0^h \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} dy + \int_0^h \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} dy - \int_0^h H(\Omega_c) \frac{\delta}{D} c dy = 0 \quad (2.27)$$

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} \int_0^h c dy + \left[ \frac{\partial c}{\partial y} \right]_0^h - \frac{\delta}{D} \int_0^{\alpha h} c dy = 0$$

Considerando che il dominio è tale per cui il rapporto lunghezza altezza è  $h/L \ll 1$ , è lecito supporre che la variazione di  $c$  lungo  $y$  sia trascurabile rispetto alla variazione lungo  $x$ , in particolare:

$$c(x, y) \simeq c(x) \quad \implies \quad \frac{\partial c}{\partial y}(x, y) \simeq \frac{\partial c}{\partial y}(x) = 0 \quad (2.28)$$

Si definisce quindi:

$$\bar{c}(x) = \frac{1}{h} \int_0^h c(x, y) dy \quad (2.29)$$



sostituendo in (2.27), si ottiene: si ottiene la seguente equazione differenziale ordinaria del secondo ordine a coefficienti costanti:

$$\frac{\partial^2 \bar{c}}{\partial x^2} - \frac{\alpha \delta}{D} \bar{c} = 0 \quad (2.30)$$

la cui soluzione è data dalle seguente combinazione lineare di funzioni esponenziali:

$$\bar{c} = A_2 e^{\eta x} + B_2 e^{-\eta x} \quad (2.31)$$

dove  $\eta = \sqrt{\frac{\alpha \delta}{D}}$ , mentre le costanti  $A_2$  e  $B_2$  si determinano imponendo le condizioni al contorno del problema in esame.

In particolare, il sistema da risolvere per ottenere la soluzione analitica del gradiente di ossigeno che si genera negli esperimenti condotti da [Arocena et al. \[2019\]](#) è:

$$\begin{cases} \bar{c}(0) = c_0 \\ \frac{\partial \bar{c}}{\partial x}(L) = 0 \\ \bar{c} = A_2 e^{\eta x} + B_2 e^{-\eta x} \end{cases} \quad (2.32)$$

Imponendo la condizione di Dirichlet (2.32)<sub>1</sub> si ottiene:

$$\bar{c}(0) = c_0 \implies A_2 + B_2 = c_0 \implies B_2 = c_0 - A_2 \quad (2.33)$$

Mentre, dalla condizione di Neumann (2.32)<sub>2</sub> si ha:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \bar{c}}{\partial x}(L) = 0 &\implies A_2 \eta (e^{\eta L} + e^{-\eta L}) = c_0 \eta e^{-\eta L} \\ &\implies A_2 = \frac{c_0 e^{-\eta L}}{e^{\eta L} + e^{-\eta L}} \end{aligned} \quad (2.34)$$

Dunque, il gradiente di ossigeno mediato lungo l'asse verticale all'interno del provino utilizzato nell'Exp.II avrà l'andamento mostrato in Figura 2.8 e sarà:

$$\bar{c}(x) = \frac{c_0 e^{-\eta L}}{e^{\eta L} + e^{-\eta L}} [e^{\eta x} - e^{-\eta x}] + c_0 e^{-\eta x} \quad (2.35)$$

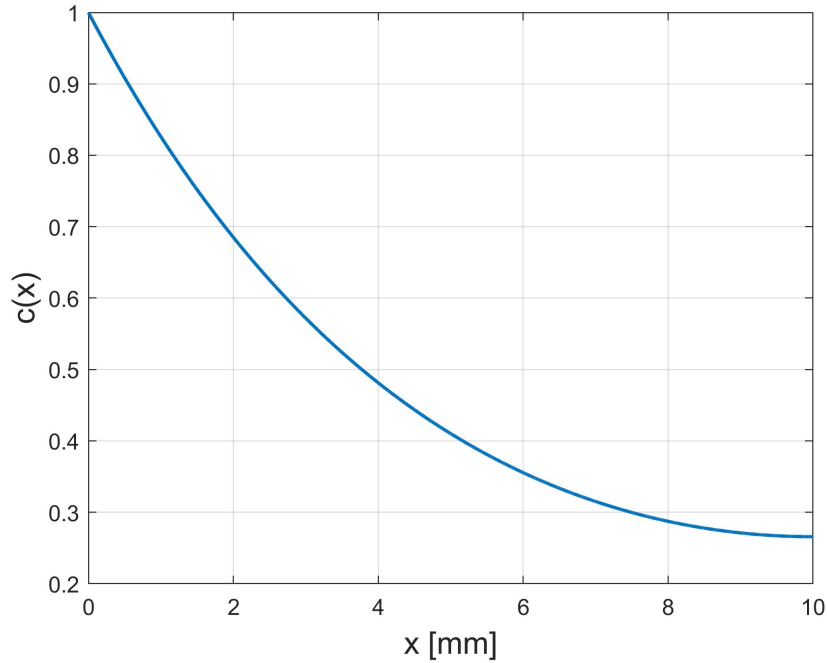


Figura 2.8: Soluzione analitica in coordinate cartesiane del gradiente di ossigeno mediato lungo l'asse verticale dell'Exp.II

### 2.2.2 Soluzione in coordinate cilindriche

Anche in questo caso è possibile definire una soluzione in coordinate cilindriche su un dominio 2D assialsimmetrico. Per fare questo però è necessario supporre che il foro nel vetrino coprioggetti sia circolare e non quadrato. Si considererà dunque un foro attorno all'asse di simmetria avente raggio  $r_d = 0.5$  mm.

Si definisce sul dominio  $\Omega$ , mostrato in figura 2.9, una funzione  $c = c(t, r, z)$  che modella la concentrazione dell'ossigeno nella posizione  $(r, z) \in \Omega$  al tempo  $t \geq 0$ .  $D$  è il coefficiente di diffusione dell'ossigeno, mentre  $\delta$  è il tasso di assorbimento dell'ossigeno da parte delle cellule che si trovano nel sottodominio  $\Omega_c \subset \Omega$ . A seguito di tali premesse, l'equazione che modella la diffusione

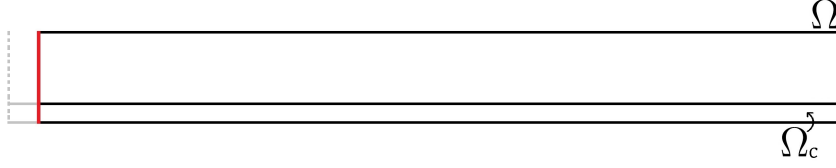


Figura 2.9: Dominio  $\Omega = [r_d, R] \times [0, h] \in \mathbb{R}^2$  su cui è definita la soluzione che modella la concentrazione di ossigeno in coordinate cilindriche. Le cellule si trovano nel sottodominio  $\Omega_c \in \Omega$ , così definito:  $\Omega_c = [r_d, R] \times [0, \alpha h]$ . La parte in cui si trova il foro (in grigio) viene trascurata e si suppone che il passaggio dell'ossigeno sia consentito da tutto il lato di sinistra (in rosso).

dell'ossigeno nel tempo all'interno del dominio  $\Omega$  è:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - \delta H(\Omega_c) c \quad \text{in } \Omega \quad (2.36)$$

dove  $H(\Omega_c)$  è una funzione di Heaviside così definita:

$$H = (\Omega_c) = \begin{cases} 1 & \text{in } \Omega_c \\ 0 & \text{altrove} \end{cases} \quad (2.37)$$

Anche qui, si studierà il problema stazionario, analizzando la situazione in cui il gradiente di ossigeno è già stato raggiunto e si mantiene costante nel tempo.

Dunque:

$$D \nabla^2 c - \delta H(\Omega_c) c = 0 \quad \text{in } \Omega \quad (2.38)$$

Esplicitando adesso il laplaciano in coordinate cilindriche si ottiene:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - \frac{\delta}{D} H(\Omega_c) c = 0 \quad \text{in } \Omega \quad (2.39)$$

Integrando tale equazione lungo l'asse  $z$ , si ottiene:

$$\int_0^h \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial c}{\partial r} \right) dz + \int_0^h \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} dz - \int_0^h \frac{\delta}{D} H(\Omega_c) c dz = 0 \quad (2.40)$$

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial}{\partial r} \int_0^h c dz \right) + \left[ \frac{\partial c}{\partial z} \right]_0^h - \frac{\delta}{D} \int_0^{\alpha h} c dz = 0$$

In base all'ipotesi di proporzionalità tra l'altezza e la lunghezza del provino ( $h \ll R$ ), si può assumere che la variazione della concentrazione di ossigeno lungo l'asse  $z$  sia trascurabile. Pertanto, si può considerare la concentrazione di ossigeno come una costante rispetto alla coordinata  $z$ , cioè:

$$c = c(r, z) \simeq c(r) \quad \Longrightarrow \quad \frac{\partial c(r, z)}{\partial z} \simeq \frac{\partial c(r)}{\partial z} = 0 \quad (2.41)$$

Si definisce, inoltre:

$$\bar{c} = c(r) = \frac{1}{h} \int_0^h c(r, z) dz \quad (2.42)$$

Sostituendo in 2.40, si ottiene:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[ r \frac{\partial h \bar{c}}{\partial r} \right] - \frac{\delta}{D} h \alpha \bar{c} = 0 \quad (2.43)$$

Sviluppando le derivate, si ottiene:

$$\bar{c}'' + \bar{c}' - \frac{\delta \alpha}{D} r \bar{c} = 0 \quad (2.44)$$

Questa è un'equazione differenziale ordinaria del secondo ordine, omogenea a coefficienti non costanti. La sua soluzione è data dalla seguente combinazione lineare [Zwillinger and Jeffrey [2007]]:

$$\bar{c} = A_2 I_0(r) + B_2 K_0(r) \quad (2.45)$$

dove le costanti  $A$  e  $B$  si definiscono imponendo le condizioni al contorno del problema in esame, mentre  $I_0$  e  $K_0$  sono le equazioni di Bessel modificate di ordine 0 definite precedentemente (2.19).

Si suppone che, nella zona in cui vi è il foro ( $0 \leq r \leq r_d$ ), la concentrazione di ossigeno sia costante e pari a  $c_0$ , mentre nella zona in cui si trova il vetrino ( $r_d < r \leq R$ ) la concentrazione di ossigeno è descritta dalla (2.45), in cui le costanti  $A_2$  e  $B_2$  sono definite dalle seguenti condizioni al bordo:

$$\begin{cases} \bar{c}(r = r_d) = c_0 \\ \frac{d\bar{c}}{dr}(r = R) = 0 \\ \bar{c} = A_2 I_0(r) + B_2 K_0(r) \quad \text{per } r_d < r \leq R \end{cases} \quad (2.46)$$

Imponendo la condizione di Neumann (2.46)<sub>2</sub>, si ottiene:

$$\frac{d\bar{c}}{dr}(R) = A_2 I_1(R) - B_2 K_1(R) = 0 \quad \implies \quad B_2 = A_2 \frac{I_1(R)}{K_1(R)} \quad (2.47)$$

dove  $I_1$  e  $K_1$  sono le funzioni di Bessel modificate di ordine 1. Dalla condizione di Dirichlet (2.46)<sub>1</sub>, si ottiene:

$$\bar{c}(r_d) = A_2 I_0(r_d) + B_2 K_0(r_d) = c_0 \quad (2.48)$$

Dunque, sostituendo  $B_2$  in (2.48) si ottiene:

$$A_2 = \frac{c_0 K_1(R)}{I_0(r_d)K_1(L/2) + K_0(r_d)I_1(R)} \quad (2.49)$$

Dunque, la concentrazione media di ossigeno all'interno del provino utilizzato per gli esperimenti condotti in [Arocena et al. \[2019\]](#) avrà l'andamento mostrato in Figura (2.10) e sarà:

$$\bar{c}(r) = \begin{cases} c_0 & \text{per } 0 \leq r < r_d \\ c_0 \frac{K_1(R)I_0(r) + I_1(R)K_0(r)}{I_0(r_d)K_1(R) + K_0(r_d)I_1(R)} & \text{per } r_d \leq r \leq R \end{cases} \quad (2.50)$$

## 2.3 Soluzione tramite sviluppo asintotico

attraverso opportune tecniche di espansione asintotica, si ricaverà la soluzione analitica per la concentrazione mediata lungo la direzione verticale, in simmetria cilindrica. Una volta definita la concentrazione di ossigeno lungo l'asse orizzontale, si può procedere calcolando, attraverso opportune tecniche di

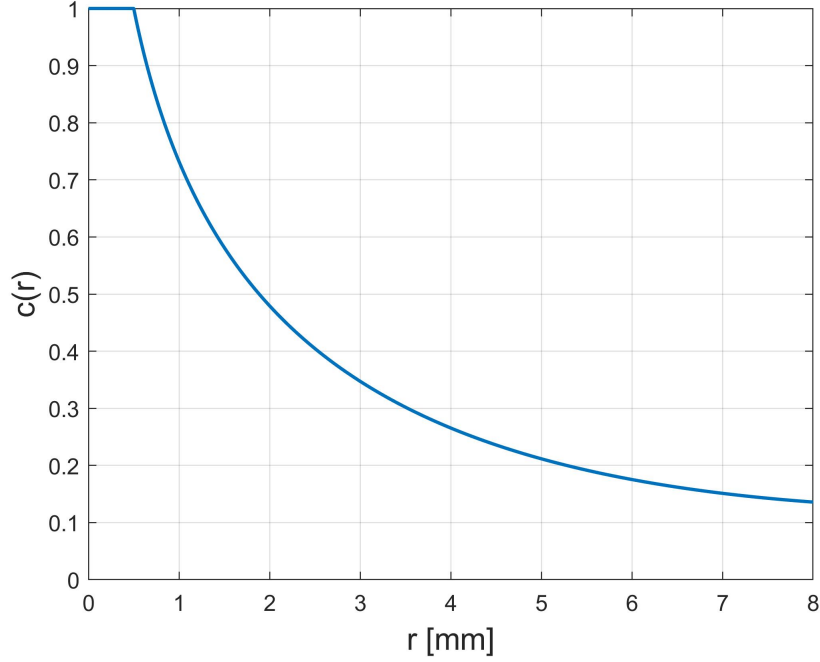


Figura 2.10: Soluzione analitica in coordinate cilindriche della concentrazione di ossigeno che si stabilizza nell'Exp.II

espansione asintotica, una soluzione analitica per la concentrazione mediata lungo la direzione verticale.

Si effettueranno i conti in coordinate cilindriche prendendo in esame l'Exp.II. Per definire una soluzione che descriva la concentrazione di ossigeno che si stabilizza all'interno del provino dell'Exp.II e che consideri la variazione sia lungo l'asse  $r$  che l'asse  $z$ , è preferibile, viste le dimensioni del dominio, effettuare il seguente cambio di variabili:

$$\tilde{r} = r \quad \tilde{z} = \frac{z}{\varepsilon} \quad (2.51)$$

dove  $\varepsilon = h/L \ll 1$ .

L'equazione (2.39), quindi diventa:

$$\frac{1}{\tilde{r}} \frac{\partial}{\partial \tilde{r}} \left( \tilde{r} \frac{\partial c(\tilde{r}, \tilde{z})}{\partial \tilde{r}} \right) + \frac{1}{\varepsilon^2} \frac{\partial^2 c(\tilde{r}, \tilde{z})}{\partial \tilde{z}^2} - \frac{\delta}{D} H(\tilde{\Omega}_c) c(\tilde{r}, \tilde{z}) = 0 \quad (2.52)$$

con le seguenti condizioni al contorno:

$$\begin{cases} c(\tilde{r} = 0, \tilde{z}) = c_0 \\ \frac{\partial c}{\partial \tilde{r}}(\tilde{r} = R, \tilde{z}) = 0 \\ \frac{\partial c}{\partial \tilde{z}}\left(\tilde{r}, \tilde{z} = 0, \frac{h}{\varepsilon}\right) = 0 \end{cases} \quad (2.53)$$

si andrà quindi a definire una soluzione dell'equazione (2.52) come sviluppo asintotico, cioè una soluzione che abbia la seguente forma:

$$c(r, z) = \bar{c}(r) + \varepsilon^n c'(r, z) = \bar{c}(\tilde{r}) + \varepsilon^n c'(\tilde{r}, \varepsilon \tilde{z}) \quad (2.54)$$

dove  $\bar{c}(r)$  è la soluzione (2.50) di (2.44).

Dunque, sostituendo la soluzione (2.54) all'equazione (2.52), si ha:

$$\frac{1}{\tilde{r}} \frac{\partial}{\partial \tilde{r}} \left( \tilde{r} \frac{\partial \bar{c}}{\partial \tilde{r}} \right) + \varepsilon^n \frac{1}{\tilde{r}} \frac{\partial}{\partial \tilde{r}} \left( \tilde{r} \frac{\partial c'}{\partial \tilde{r}} \right) + \frac{\varepsilon^n}{\varepsilon^2} \frac{\partial^2 c'}{\partial \tilde{z}^2} - \frac{\delta}{D} H(\tilde{z}) \bar{c} - \frac{\delta}{D} H(\tilde{z}) c' \varepsilon^n = 0 \quad (2.55)$$

Ponendo  $n = 2$  e trascurando i termini di ordine superiore, si ottiene:

$$\begin{cases} \frac{\partial^2 c'}{\partial \tilde{z}^2} = \frac{\delta}{D} H(\tilde{z}) \bar{c} - \frac{1}{\tilde{r}} \frac{\partial}{\partial \tilde{r}} \left( \tilde{r} \frac{\partial \bar{c}}{\partial \tilde{r}} \right) \\ \frac{\partial c'}{\partial \tilde{z}} \left( \tilde{z} = 0, \frac{h}{\varepsilon} \right) = 0 \end{cases} \quad (2.56)$$

dove si nota che  $\frac{h}{\varepsilon} = R$ , mentre  $H(\tilde{z})$  è la funzione di Heavyside così definita:

$$H(\tilde{z}) = \begin{cases} 1 & \text{per } 0 \leq \tilde{z} \leq \alpha R \\ 0 & \text{per } \alpha R < \tilde{z} \leq R \end{cases} \quad (2.57)$$

Sfruttando la relazione (2.43), si ottiene:

$$\frac{\partial^2 c'}{\partial \tilde{z}^2} = \frac{\delta}{D} H(\tilde{z}) \bar{c} - \frac{\delta}{D} \alpha \bar{c} \quad (2.58)$$

In conclusione le equazioni da risolvere nei rispettivi domini sono:

$$\begin{cases} \frac{\partial^2 c'_1}{\partial \tilde{z}^2} = \frac{\delta}{D}(1 - \alpha)\bar{c} & \text{per } 0 \leq \tilde{z} \leq \alpha R \\ \frac{\partial^2 c'_2}{\partial \tilde{z}^2} = -\frac{\delta}{D}\alpha\bar{c} & \text{per } \alpha R < \tilde{z} \leq R \end{cases} \quad (2.59)$$

dove  $\bar{c}$  è la soluzione (2.50) di (2.44). Per ottenere una soluzione a tali equazioni è necessario definire delle opportune condizioni al contorno; inoltre, esse devono rispettare le condizioni di continuità all'interfaccia. Dunque il sistema di equazioni da risolvere è il seguente:

$$\begin{cases} \frac{\partial^2 c'_1}{\partial \tilde{z}^2} = \frac{\delta}{D}(1 - \alpha)\bar{c} & \text{per } 0 \leq \tilde{z} \leq \alpha R \\ \frac{\partial^2 c'_2}{\partial \tilde{z}^2} = -\frac{\delta}{D}\alpha\bar{c} & \text{per } \alpha R < \tilde{z} \leq R \\ \frac{\partial c'_1}{\partial \tilde{z}} = 0 & \text{su } \tilde{z} = 0 \\ \frac{\partial c'_2}{\partial \tilde{z}} = 0 & \text{su } \tilde{z} = R \\ c'_1 = c'_2 & \text{in } \tilde{z} = \alpha R \\ D \frac{\partial c'_1}{\partial \tilde{z}} = D \frac{\partial c'_2}{\partial \tilde{z}} & \text{in } \tilde{z} = \alpha R \end{cases} \quad (2.60)$$

Dove (2.60)<sub>3</sub> e (2.60)<sub>4</sub> rappresentano le condizioni al contorno di Neumann, mentre (2.60)<sub>5</sub> e (2.60)<sub>6</sub> rappresentano le condizioni di continuità all'interfaccia. Partendo dalle equazioni (2.60)<sub>1</sub> e (2.60)<sub>2</sub> e integrando due volte rispetto a  $\tilde{z}$  si ottengono rispettivamente:

$$\begin{aligned} c'_1 &= \frac{\delta}{D}(1 - \alpha)\bar{c} \frac{\tilde{z}^2}{2} + A_1\tilde{z} + B_1 \\ c'_2 &= -\frac{\delta}{D}\alpha\bar{c} \frac{\tilde{z}^2}{2} + A_2\tilde{z} + B_2 \end{aligned} \quad (2.61)$$

Le costanti  $A_1$ ,  $A_2$  e  $B_1$  si ottengono applicando le condizioni di continuità sull'interfaccia (2.60)<sub>5</sub> e (2.60)<sub>6</sub> e le condizioni al contorno di Neumann (2.60)<sub>3</sub> e (2.60)<sub>4</sub> e valgono rispettivamente:



- $A_1 = 0$ ;
- $A_2 = \frac{\delta}{D} \alpha R \bar{c}$ ;
- $B_1 = \frac{\delta \alpha^2 R^2}{2D} \bar{c} + B_2$

Sostituendo in (2.61), si ottiene:

$$\begin{aligned} c'_1 &= \frac{\delta}{D} (1 - \alpha) \bar{c} \frac{\tilde{z}^2}{2} + \frac{\delta \alpha^2 R^2}{2D} \bar{c} + B_2 \\ c'_2 &= -\frac{\delta}{D} \alpha \bar{c} \frac{\tilde{z}^2}{2} + \frac{\delta}{D} \alpha R \bar{c} \tilde{z} + B_2 \end{aligned} \quad (2.62)$$

Per definire la costante  $B_2$  si assume che  $\bar{c}$  rappresenta la media di  $c(\tilde{r}, \varepsilon \tilde{z})$  e dunque, se questo è vero, necessariamente deve accadere che la media di  $c'(\tilde{r}, \varepsilon \tilde{z})$  sia pari a zero, cioè:

$$\frac{1}{h} \int_0^h c' dz = \frac{1}{h} \int_0^{\alpha R} c'_1 d\tilde{z} + \frac{1}{h} \int_{\alpha R}^R c'_2 d\tilde{z} = 0 \quad (2.63)$$

Sostituendo in questa equazione le espressioni di  $c'_1$  e  $c'_2$  date da (2.62), si ottiene:

$$B_2 = -\frac{\delta \alpha R^2}{6D} (\alpha^2 + 2) \bar{c} \quad (2.64)$$

E dunque:

$$\begin{aligned} c'_1 &= \frac{\delta}{D} (1 - \alpha) \bar{c} \frac{\tilde{z}^2}{2} + \frac{\delta \alpha^2 R^2}{2D} \bar{c} - \frac{\delta \alpha R^2}{6D} (\alpha^2 + 2) \bar{c} \quad \text{con } \tilde{z} \in [0, \alpha R] \\ c'_2 &= -\frac{\delta}{D} \alpha \bar{c} \frac{\tilde{z}^2}{2} + \frac{\delta}{D} \alpha R \bar{c} \tilde{z} - \frac{\delta \alpha R^2}{6D} (\alpha^2 + 2) \bar{c} \quad \text{con } \tilde{z} \in [\alpha R, R] \end{aligned} \quad (2.65)$$

In conclusione, tornando alle variabili originarie, la soluzione della equazione di diffusione dell'ossigeno che include la variazione lungo  $z$ , ottenuta mediante uno sviluppo asintotico, è:

$$\begin{aligned} c_1(r, z) &= \bar{c} + \frac{\delta}{D} \bar{c} \left[ (1 - \alpha) \frac{z^2}{2} + \frac{\alpha h^2}{6} [3\alpha - \alpha^2 - 2] \right] \quad \text{con } z \in [0, \alpha h] \\ c_2(r, z) &= \bar{c} + \frac{\delta}{D} \bar{c} \left[ -\frac{\alpha z^2}{2} + \alpha h z - \alpha (\alpha^2 + 2) \frac{h^2}{6} \right] \quad \text{con } z \in [\alpha h, h] \end{aligned} \quad (2.66)$$

dove  $\bar{c}$  è data da (2.50). Una volta ottenuta tale soluzione in coordinate cilindriche è possibile, procedendo in maniera analoga, dedurre la corrispondente equazione in coordinate cartesiane che è:

$$\begin{aligned} c_1(x, y) &= \bar{c} + \frac{\delta}{D} \bar{c} \left[ (1 - \alpha) \frac{y^2}{2} + \frac{\alpha h^2}{6} [3\alpha - \alpha^2 - 2] \right] && \text{con } y \in [0, \alpha h] \\ c_2(x, y) &= \bar{c} + \frac{\delta}{D} \bar{c} \left[ -\frac{\alpha y^2}{2} + \alpha h y - \alpha (\alpha^2 + 2) \frac{h^2}{6} \right] && \text{con } y \in [\alpha h, h] \end{aligned} \quad (2.67)$$

dove  $\bar{c}$  è data da (2.35).

### 2.3.1 Condizione di assorbimento

Se si osserva il dominio  $\Omega$  (Figura 2.9) su cui è definita la soluzione (2.66), si può notare che lo strato cellulare, situato nel sottodominio  $\Omega_c$ , è molto più sottile rispetto all'altezza dell'intero dominio.

Per tale motivo è possibile, partendo dalla soluzione (2.66)<sub>1</sub>, ottenere una condizione di assorbimento equivalente che sostituisca il dominio  $\Omega_c$ . Dunque, per  $\alpha \rightarrow 0$  lo strato cellulare può essere sostituito dalla seguente condizione di assorbimento applicata in  $z = \alpha h$ :

$$D \frac{\partial c}{\partial z}(z = \alpha h) = \frac{\delta}{D} \bar{c} (1 - \alpha) \alpha h \quad (2.68)$$

Eliminando i termini di ordine superiore, si ottiene:

$$D \frac{\partial c}{\partial z}(z = \alpha h) \approx \frac{\delta}{D} \alpha h \bar{c} \quad (2.69)$$

In Figura 2.12 infine è rappresentato il confronto tra le soluzioni delle simulazioni numeriche con il dominio e con la condizione di assorbimento equivalente.

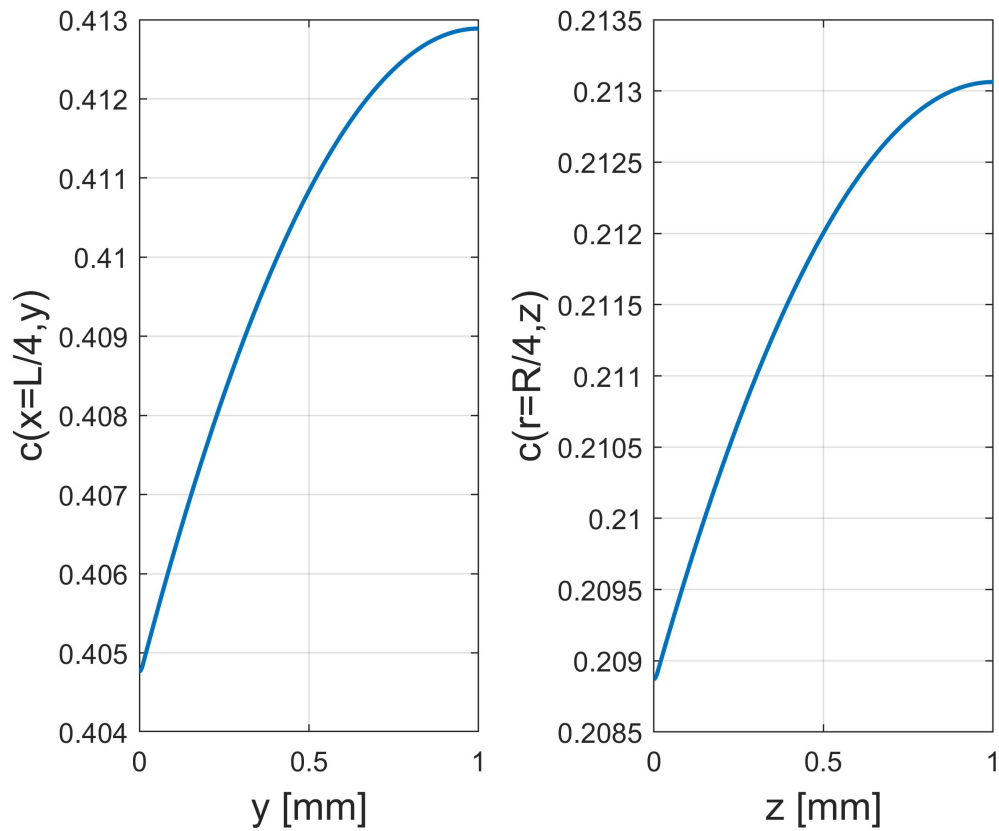


Figura 2.11: Soluzione analitica della concentrazione di ossigeno lungo l'asse verticale in simmetria cartesiana (a sinistra) e in simmetria cilindrica (a destra) nell'Exp.II.

## 2.4 Simulazioni numeriche

Le Simulazioni numeriche che verranno presentate in questo paragrafo sono state condotte utilizzando il software Comsol Multiphysics® [com]. Tale programma di simulazione numerica si basa sul metodo degli elementi finiti e consente di trovare soluzioni approssimate a problemi matematici che coinvolgono sistemi di equazioni differenziali parziali, anche accoppiati con equazioni differenziali ordinarie.

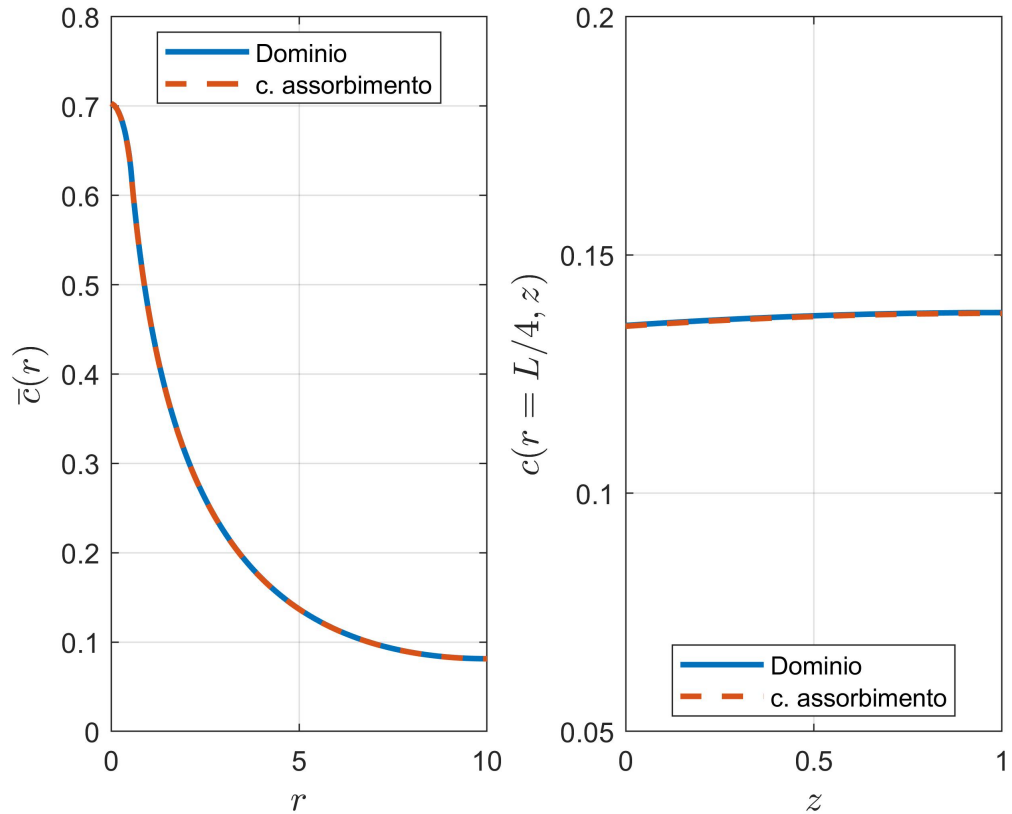


Figura 2.12: Graffici di confronto della concentrazione di ossigeno lungo  $r$  (a destra) e della concentrazione di  $O_2$  lungo l'asse verticale  $r = R/4$ .

### 2.4.1 Simulazioni numeriche Exp.I [Honda et al. [2021]]

In questa sezione verranno discusse le simulazioni numeriche effettuate per ottenere la distribuzione della concentrazione di ossigeno osservata nell'Exp.I [Honda et al. [2021]]. In particolare sono state condotte due simulazioni: i risultati della prima (Simulazione 1), in cui è stato utilizzato un modello 2D, verranno confrontati con le soluzioni analitiche in coordinate cartesiane, mentre i risultati della seconda (Simulazione 2), in cui è stato utilizzato un modello 2D

assialsimmetrico, verranno confrontati con le soluzioni analitiche in coordinate cilindriche.

Il dominio geometrico su cui è stata condotta la simulazione **1** è un rettangolo di lunghezza  $L = 7.5$  mm e altezza  $h = 10$   $\mu\text{m}$ . Tale rettangolo inoltre rappresenta la sezione trasversale del dominio utilizzato per la simulazione **2** che ruota lungo l'asse di simmetria  $r = 0$ .

Per entrambe le simulazioni è stata utilizzata un'equazione stabilizzata di convezione-diffusione con un coefficiente di diffusione  $D = 4.17 \cdot 10^{-4}$   $\text{mm}^2/\text{s}$ , ricavato calcolando graficamente la lunghezza diffusiva  $\lambda = \sqrt{D/\delta}$  (Figura 1.3), e un tasso di assorbimento  $\delta = 1.7 \cdot 10^{-3}$   $\text{s}^{-1}$ . La scelta di tale valore per  $\delta$  deriva dal fatto che il gradiente di ossigeno si forma dopo circa 10 minuti dal posizionamento del vetrino.

Sul dominio (rettangolare) è stata definita una mesh triangolare non strutturata con 18008 gradi di libertà. I risultati di entrambe le simulazioni, riportati in Figura 2.13 e 2.14, sono relativi ad uno studio stazionario, quindi confrontabili con le soluzioni analitiche ottenute nei paragrafi precedenti.

In Figura 2.15 vengono infine confrontati risultati della simulazione **1** e della simulazione **2** rispettivamente con le soluzioni analitiche (2.11) e (2.23).

Si può notare come le approssimazioni fatte per ottenere le soluzioni analitiche sono ragionevoli in quanto i risultati ottenuti coincidono con le soluzioni numeriche.

### 2.4.2 Simulazioni numeriche Exp.II [[Arocena et al. \[2019\]](#)]

Anche per l'Exp.II [[Arocena et al. \[2019\]](#)] sono state effettuate due simulazioni, la prima su un modello 2D (Simulazione **1**), la seconda su un modello 2D

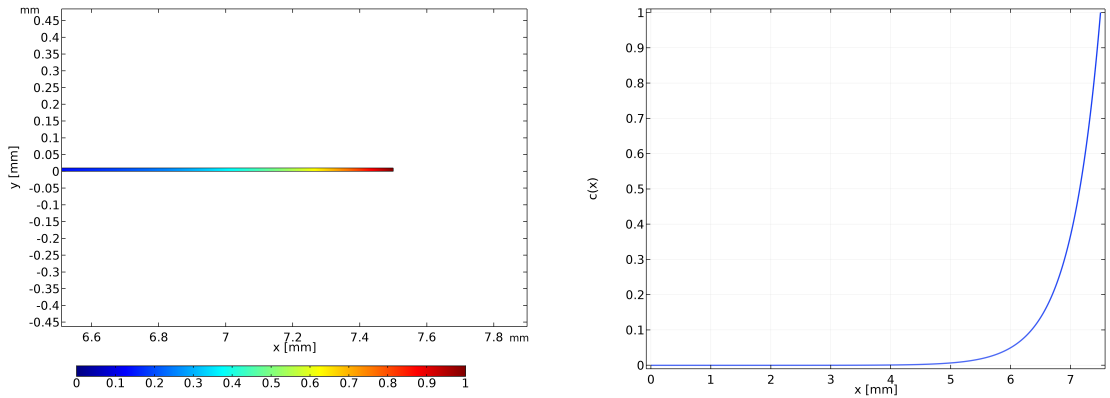


Figura 2.13: Soluzioni simulazione numerica **1**. A sinistra parte dominio 2D (?). A destra, concentrazione di ossigeno lungo l'asse orizzontale  $x$  in  $z = h/2$ .

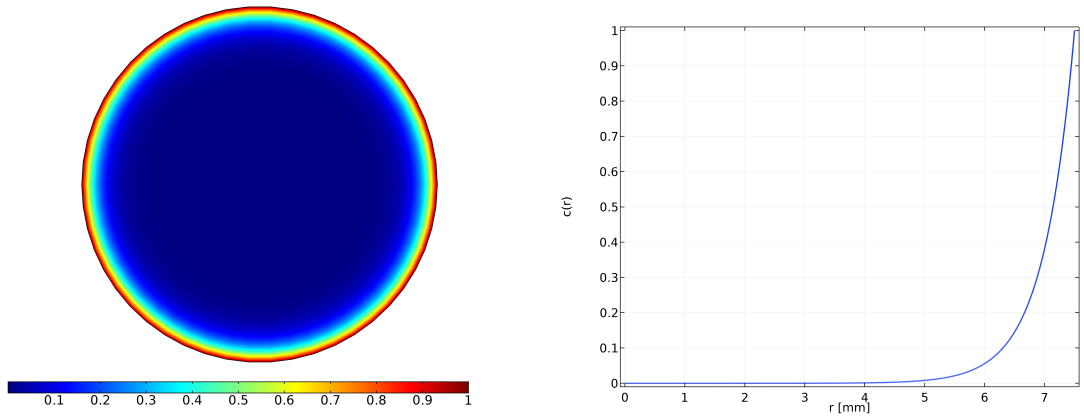


Figura 2.14: Soluzioni simulazione numerica **2**. A sinistra, il dominio 2D assialsimmetrico visto dall'alto. A destra, cocentrazione di ossigeno lungo l'asse orizzontale  $r$  in  $z = h/2$ .

assialsimmetrico (Simulazione **2**). Le soluzioni ottenute sono state confrontate rispettivamente con le soluzioni analitiche in coordinate cartesiane (2.35) e in coordinate cilindriche (2.50) e, infine, con le soluzioni (2.67) e (2.66) ottenute mediante opportune tecniche di sepansione asintotiche.

Il dominio geometrico su cui è stata condotta la simulazione **1** è formato da un rettangolo  $\Omega$  di lunghezza  $L = 10$  mm e altezza  $h = 1$  mm. All'interno di questo è presente un altro rettangolo avente stessa lunghezza  $L$  e altezza

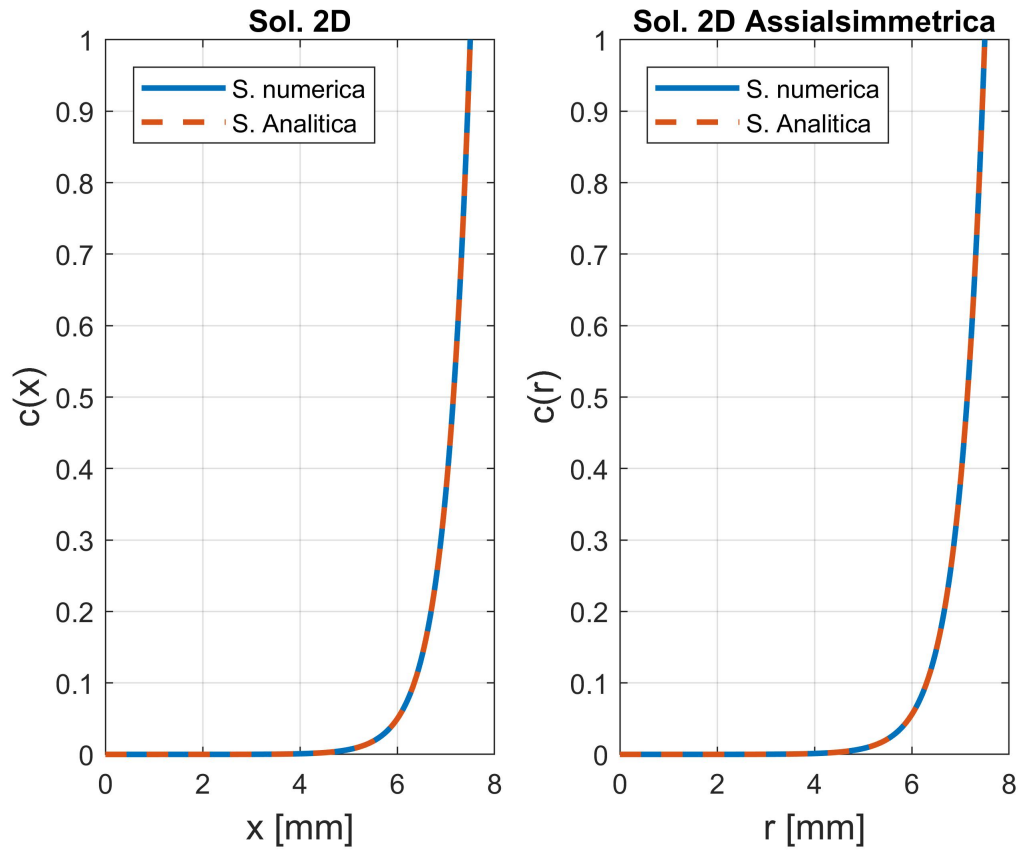


Figura 2.15

$h_c = 1 \mu\text{m}$ . Questo, posizionato sul fondo di  $\Omega$ , rappresenta la zona in cui è presente lo strato cellulare. Tale rettangolo inoltre rappresenta la sezione trasversale del dominio utilizzato per la simulazione **2**.

Poichè il gradiente di ossigeno si stabilizza dopo circa 24 ore, è stato preso un tasso di assorbimento  $\delta = 1.16 \cdot 10^{-5} \text{ 1/s}$ . Non avendo dati sufficienti per calcolare il coefficiente di diffusione, questo è stato dedotto a partire dalla lunghezza diffusiva dell'Exp.I. In particolare, tenendo conto che l'ossigeno diffonde su tutto il dominio avente altezza  $H$ , mentre le cellule si trovano nel sottodominio di altezza  $h_c$ , è stata definita una lunghezza diffusiva,  $\lambda = \sqrt{DH/\delta h_c} = 5 \text{ mm}$ .

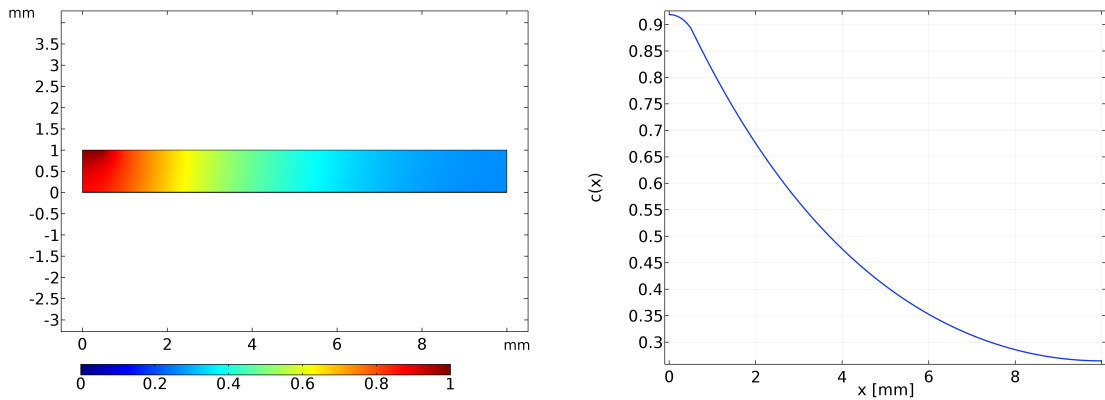


Figura 2.16: Soluzioni simulazione numerica **1**. A sinistra, il dominio 2D. A destra, cocentrzione di ossigeno lungo l'asse orizzontale  $x$  mediato lungo l'asse verticale.

Dunque è stato dedotto un coefficiente di diffusione  $D = 2.89 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ .  
 infine, è stata definita una mesh triangolare non strutturata avente 149641 gradi di libertà.

I risultati di entrambe le simulazioni, riportati in Figura 2.16 e 2.17, sono relativi ad uno studio stazionario, quindi confrontabili con le soluzioni analitiche ottenute nei paragrafi precedenti.

Infine, in Figura 2.18 vengono confrontati i risultati delle simulazioni **1** e **2** rispettivamente con le soluzioni analitiche (2.35) in coordinate cartesiane e (2.50) in coordinate cilindriche. Se per la soluzione in coordinata cartesiane, nonostante le approssimazioni fatte, si ottiene un risultato coerente con le simulazioni numeriche, la stessa cosa non avviene per la soluzione in coordinate cilindriche. Qui infatti la soluzione analitica è sovrastimata. Questo è dovuto al fatto che la concentrazione nella zona del foro non è costante e pari alla concentrazione iniziale dovunque, ma è inferiore.



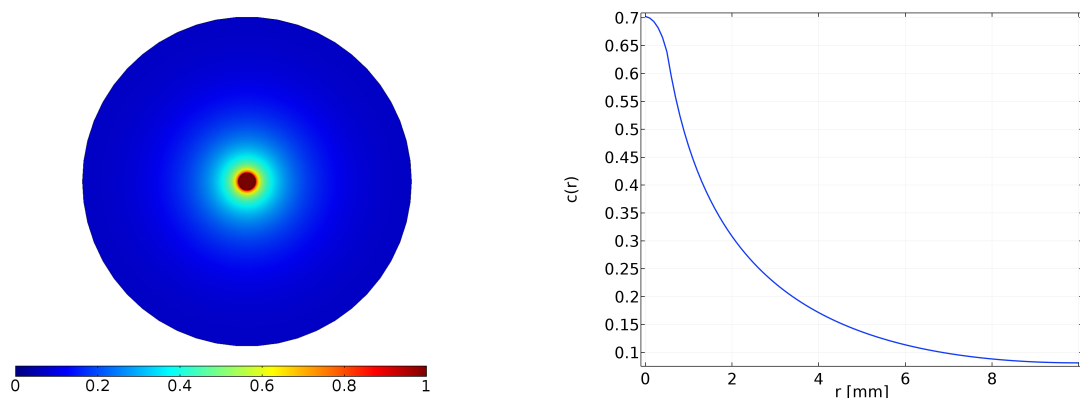


Figura 2.17: Soluzioni simulazione numerica **2**. A sinistra, il dominio 2D assialsimmetrico visto dall'alto. A destra, cocentrazione di ossigeno lungo l'asse orizzontale  $r$  mediata lungo l'asse verticale.

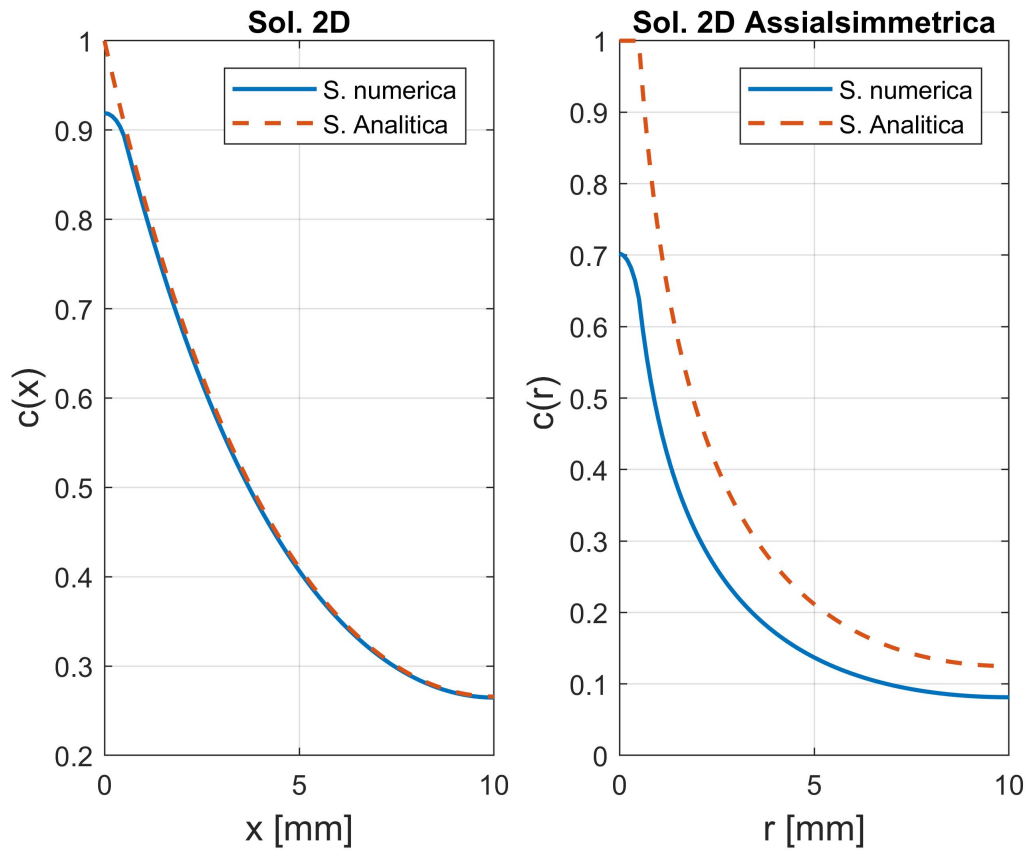


Figura 2.18: A sinistra, Confronto tra la soluzione analitica data dall'equazione (2.35) in coordinate cartesiane e la soluzione della simulazione numerica del modello 2D. A destra, Confronto tra la soluzione analitica data dall'equazione (2.50) in coordinate cilindriche e la soluzione della simulazione numerica del modello 2D assialsimmetrico.

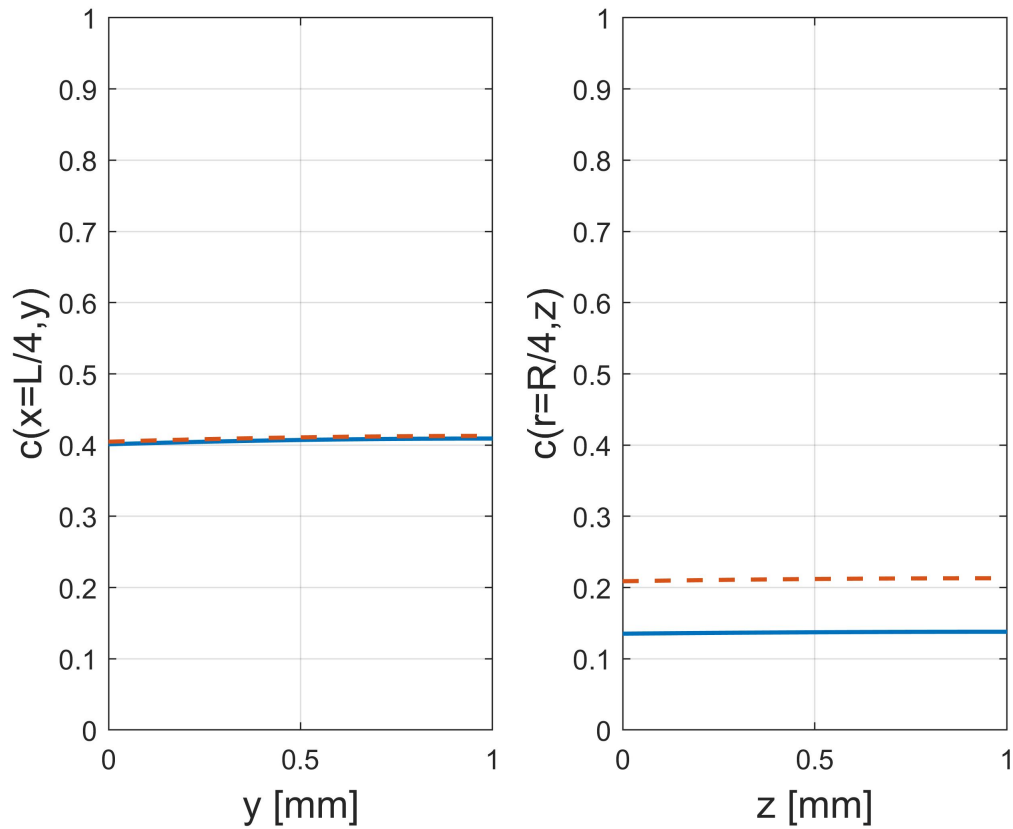


Figura 2.19: A sinistra, Confronto tra la soluzione analitica data dall'equazione (2.67) in coordinate cartesiane e la soluzione della simulazione numerica del modello 2D. A destra, Confronto tra la soluzione analitica data dall'equazione (2.66) in coordinate cilindriche e la soluzione della simulazione numerica del modello 2D assialsimmetrico.



## Capitolo 3

# Dinamica HIF-PHD

Nel seguente capitolo si analizzerà più nello specifico la dinamica che avviene tra HIF e PHD, un fenomeno cruciale nella regolazione cellulare, in cui l'ossigeno gioca un ruolo fondamentale. Esistono però fattori diversi dall'ossigeno che possono modulare la sua attività e la stabilità del fattore di trascrizione HIF, tra questi si distingue il pH. In questo capitolo si analizzerà nello specifico l'inerconnessione tra HIF1 e PHD2, il ruolo cruciale giocato dall'ossigeno in questo interplay, e la funzione del pH come meccanismo  $O_2$ /PHD-indipendente di regolazione di HIF1. La PHD2 fa parte della famiglia PHD di prolil-idrossilasi accomunate dagli stessi cofattori, tra cui l'ossigeno, e dalla stessa reazione di idrossilazione che viene promossa sulla subunità  $\alpha$  di HIF target differenti (HIF1, HIF2, HIF3).

Nella prima parte del capitolo, verrà introdotto un modello matematico che studia l'evoluzione temporale della dinamica HIF1-PHD2, in funzione esclusivamente dell'ossigeno.

Nella seconda parte, a partire dal modello matematico precedente, si introdurrà

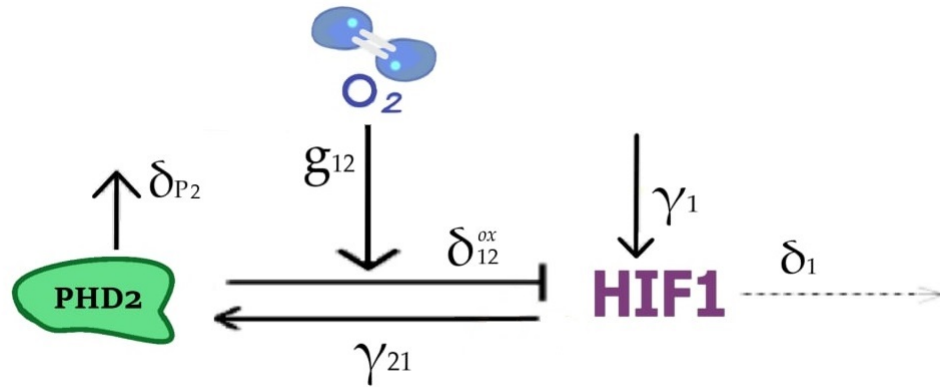


Figura 3.1: Dinamica HIF-PHD ossigeno dipendente [Ferrante et al. [2023]]

una dipendenza dal pH con l'obiettivo di riprodurre la particolare distribuzione ad anello di HIF1 descritta da Honda et al. in [Honda et al. [2021]]. Si ricorda che nel lavoro di riferimento [Honda et al. [2021]] effettuano una analisi qualitativa delle diverse quantità coinvolte e non viene fornita una spiegazione biologica specifica del fenomeno osservato.

Data la mancanza di informazioni dettagliate sul meccanismo biologico causa della formazione dell'anello, si definirà una funzione che introduca la dipendenza dal pH e una sua possibile distribuzione lungo il dominio dell'Exp.I, prendendo come riferimento i risultati mostrati da Honda [Honda et al. [2021]] e da Filatova [Filatova et al. [2016]].

### 3.1 Dinamica HIF1-PHD2 ossigeno dipendente

Entrando nello specifico all'interno di tale dinamica, è noto che le PHDs si attivano in presenza di ossigeno e idrossilano l'HIF su due residui di proline.

Tale reazione converte la subunità HIF $\alpha$  in una forma idrossilata che ha una forte affinità per il complesso di ubiquitinazione legato alla proteina soppressore del tumore (VHL). Di conseguenza, in condizioni normossiche, HIF $\alpha$  viene degradato rapidamente nel proteasoma. Al contrario, in condizioni ipossiche l'attività catalitica delle PHDs diminuisce; questo si accumula e dimerizza con la sottounità  $\beta$ . l'HIF1 fattore di trascrizione, si lega a sequenze specifiche di DNA dei geni target di HIF1, gli elementi di risposta all'ipossia- HRE, permettendo quindi la trascrizione di migliaia di geni che codificano per proteine coinvolte nell'adattamento all'ipossia [Ferrante et al. [2023]].

Esistono in letteratura diversi modelli matematici [Leedale et al. [2014]] che descrivono l'evoluzione di HIF1 in ipossia. Quello che si prenderà in esame è un sistema di due equazioni differenziali ordinarie che modellizzano rispettivamente l'evoluzione temporale dei livelli nucleari di HIF1 e cellulari di PHD2,[Ferrante et al. [2023]], descritti dalle variabili  $H_1$  e  $P_2$ , rispettivamente. HIF1 è sintetizzata con un tasso  $\gamma_1$ , mentre si degrada in modo indipendente dall'ossigeno ad un tasso  $\delta_1$ . Per quanto riguarda invece la degradazione di HIF1 ossigeno-dipendente operata dalla PHD2, questa avviene con un tasso  $\delta_{12}^{ox}$ , mentre la PHD2 ha un tasso di degradazione  $\delta_{P_2}$ ; tale dinamica è rappresentata in Figura 3.1.

Dunque, l'evoluzione di HIF1 è data dalla seguente equazione:

$$\frac{dH_1}{dt} = \gamma_1 - \delta_1 H_1 - \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) F_{12}(H_1) P_2 \quad (3.1)$$

dove

$$g_{12}(O_2) = \frac{O_2}{K_{12}^{ox} + O_2} \quad F_{12}(H_1) = \frac{H_1}{K_{12} + H_1} \quad (3.2)$$

sono termini di Michaelis-Menten (M-M);  $F_{12}$  descrive la degradazione di HIF1 da parte della PHD2, che a sua volta viene promossa dalla presenza dell'ossigeno

come descritto dal termine  $g_{12}$ .

La produzione della PHD2 è regolata dalla seguente equazione di reazione:

$$\frac{dP_2}{dt} = \Gamma_2(H_1) - \delta_{P_2} P_2. \quad (3.3)$$

dove  $\delta_{P_2}$  rappresenta il tasso di degradazione naturale di PHD2. La funzione  $\Gamma_2(H_1)$ , che rappresenta la produzione di PHD2 da parte di HIF1, deve soddisfare determinate ipotesi per avere un significato biologico. In particolare, poiché HIF1 induce PHD2, si cerca una funzione che cresca all'aumentare di HIF1 e che si annulli per  $HIF1 \rightarrow 0$ , cioè:

- $\Gamma_2(0) = 0$ ;
- $\frac{\partial \Gamma_2}{\partial H_1}(H_1) > 0$ .

La funzione più semplice che soddisfa tali ipotesi è:  $\Gamma_2(H_1) = \gamma_{12}H_1$ .

Riassumendo, il sistema di ODE che modella la dinamica tra l'HIF1 e le PHD2 è:

$$\begin{cases} \frac{dH_1}{dt} = \gamma_1 - \delta_1 H_1 - \delta_{12}^{ox} \frac{O_2}{K_{12}^{ox} + O_2} \frac{H_1}{K_{12} + H_1} P_2 \\ \frac{dP_2}{dt} = \gamma_{12} H_1 - \delta_{P_2} P_2 \end{cases} \quad (3.4)$$

I valori dei parametri utilizzati sono riportati nella tabella (3.1).

Per risolvere il sistema di equazioni (3.4) è necessario conoscere l'andamento spazio-temporale della concentrazione di ossigeno,  $O_2$ . Il modello sviluppato in [Ferrante et al. [2023]] prevedeva una concentrazione di ossigeno modellizzata da una funzione omogenea in spazio e costante a tratti in tempo con valori costanti nei due intervalli temporali pari alle condizioni normossiche e ipossiche rispettivamente.

In questo lavoro, invece, viene modellizzata una condizione di ossigenazione non



Parametri	Valore
Produzione di base HIF1	$\gamma_1 = 1.667 \mu\text{M}/\text{s}$
Degradazione naturale HIF1	$\delta_1 = 1.667 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Degradazione naturale di PHD2	$\delta_{P_2} = 1.667 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Produzione di PHD2 by HIF1	$\gamma_{21} = 6.68 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Degradazione di HIF1 by PHD2	$\delta_{12}^{ox} = 1.667 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$
Costante di M-M ( $O_2$ )	$K_{12}^{ox} = 100 \mu\text{M}$
Costante di M-M (HIF1)	$K_{12} = 14 \mu\text{M}$

Tabella 3.1: Parametri utilizzati per il modello matematico

omogenea, più vicina alle condizioni *in vivo*, che si basa sugli studi sperimentali effettuati da Honda. Nel loro lavoro, Honda et al. ricreano un gradiente di ossigeno tramite apposizione di un vetrino, riportando un tempo caratteristico di arrivo allo stato stazionario di 10 minuti circa dal posizionamento del vetrino coprioggetti. Si formano quindi delle aree normossiche ( $O_2=10\%$ ), alla periferia del vetrino, e delle aree ipossiche, quelle più interne, caratterizzate da un progressivo decremento della disponibilità di ossigeno.

Tale condizione, è stata dedotta analiticamente nella sezione 2.1 e confrontata con le simulazioni numeriche riportate in sezione 2.4.1. Queste saranno il punto di partenza per le nuove simulazioni che modellano la dinamica HIF1-PHD2.

### 3.1.1 Soluzione all'equilibrio

Una volta definito il modello matematico che descrive la dinamica HIF1-PHD2 è possibile definire analiticamente lo stato di equilibrio di tale sistema. Dunque:

$$\begin{cases} \frac{dH_1}{dt} = 0 \\ \frac{dP_2}{dt} = 0 \end{cases} \rightarrow \begin{cases} \gamma_1 - \delta_1 H_1^{eq} - \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) F_{12}(H_1^{eq}) P_2^{eq} = 0 \\ \Gamma_2(H_1) - \delta_{P_2} P_2^{eq} = 0 \end{cases} \quad (3.5)$$

Dalla (3.5)<sub>2</sub> si ottiene:

$$P_2^{eq} = \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}} H_1^{eq} \quad (3.6)$$

Sostituendo questo risultato in (3.5) si ottiene:

$$\gamma_1 - \delta_1 H_1^{eq} - \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) F_{12}(H_1^{eq}) \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}} H_1^{eq} = 0 \quad (3.7)$$

Esplicitando  $F_{12}$ , si ha:

$$\gamma_1 - \delta_1 H_1^{eq} - \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}} \frac{(H_1^{eq})^2}{K_{12} + H_1^{eq}} = 0 \quad (3.8)$$

Dunque, l'equazione da risolvere per trovare lo stato di equilibrio del sistema (3.4) è:

$$\left( \delta_1 + \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2) \frac{\gamma_{21}}{\delta_{P_2}} \right) (H_1^{eq})^2 - (\gamma_1 - \delta_1 K_{12}) H_1^{eq} - \gamma_1 K_{12} = 0 \quad (3.9)$$

A causa della positività richiesta per la funzione  $F_{12}$ , l'equazione (3.9) ha solo una soluzione, rappresentata in Figura 3.2, che è:

$$H_1^{eq} = \frac{\gamma_1 - \delta_1 K_{12} + \sqrt{(\gamma_1 - \delta_1 K_{12})^2 + 4 K_{12} \gamma_1 \left( \delta_1 + \frac{\delta_{12}^{ox} \gamma_{21}}{\delta_{P_2}} g_{12}(O_2) \right)}}{2 \left( \delta_1 + \frac{\delta_{12}^{ox} \gamma_{21}}{\delta_{P_2}} g_{12}(O_2) \right)} \quad (3.10)$$

## 3.2 HIF1 e la dipendenza dal pH

L'obiettivo di questa sezione è includere nel modello matematico descritto nel paragrafo 3.1 una dipendenza dal pH, con lo scopo di ottenere la particolare distribuzione ad anello di HIF1 evidenziata nell'Exp.I.

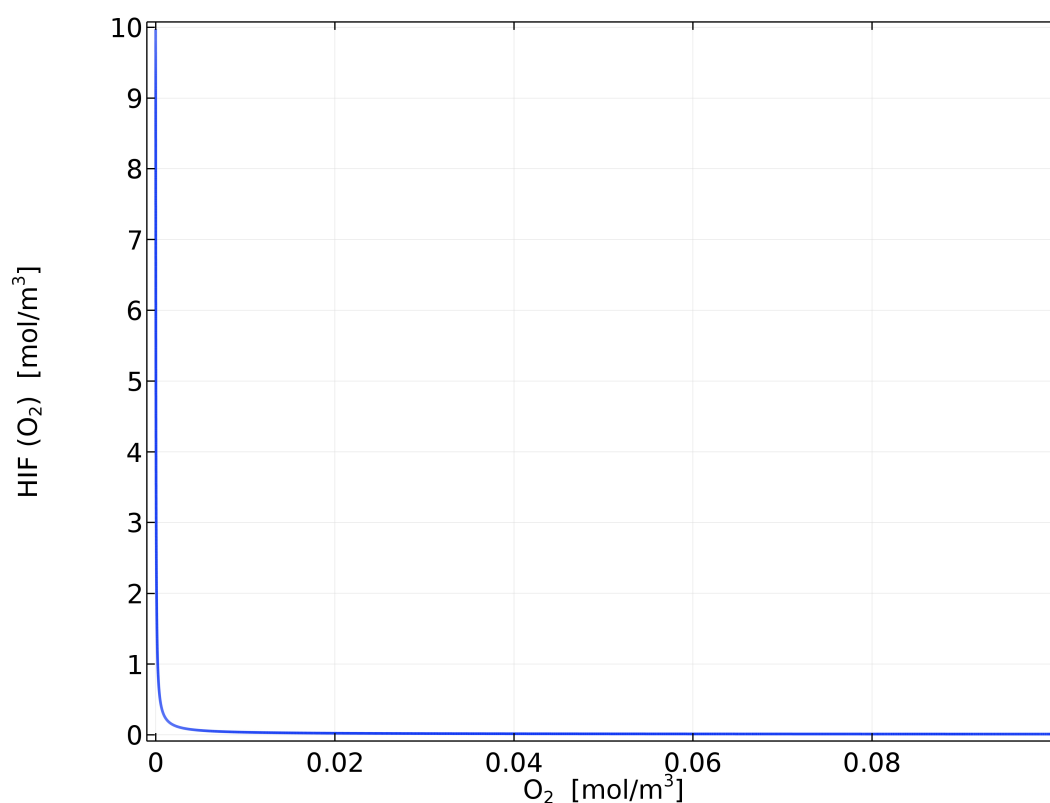


Figura 3.2: Soluzione analitica della concentrazione di HIF all'equilibrio al variare dell'ossigeno

Per fare questo però, le informazioni fornite da Honda et al. non sono sufficienti: loro propongono un possibile meccanismo di formazione dell'anello che suppone l'esistenza di un gradiente di pH da loro riportano sperimentalmente, senza però approfondire il meccanismo biologico che lega questo alla regolazione di HIF1. Tali mancanze rappresentano alcuni dei limiti di tale studio.

Per tale motivo si rende necessaria l'integrazione di informazioni ricavate da altri studi biologici [Filatova et al. [2016]] sulla dipendenza di HIF dal pH.

Le informazioni riguardo all'anello di espressione di HIF1, che possono essere reperite nel lavoro di Honda e sulle quali si baserà il modello sono le seguenti:

- L'anello si forma sul bordo dell'area positiva al pimonizadole, cioè sul

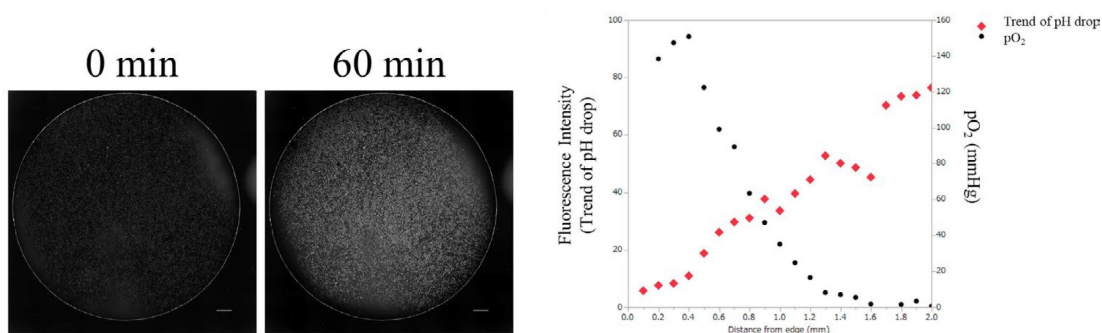


Figura 3.3: A sinistra, L'immagine che mostra l'intensità di fluorescenza delle cellule HK-2 appena coperte dal vetrino e dopo 60 minuti. A destra, Correlazione tra la diminuzione della tensione di ossigeno e la tendenza della diminuzione del pH attorno ai bordi del vetrino [Honda et al. [2021]].

bordo dell'area ipossica;

- L'intensità di espressione di HIF1 è significativamente più alta sull'anello, rispetto alle regioni più interne o esterne ad esso;
- Inizia a formarsi dopo circa 1 h dal posizionamento del vetrino e raggiunge uno stato stazionario dopo circa 3 ore;
- Le caratteristiche dell'anello variano a seconda della disponibilità di ossigeno: in condizioni di concentrazione omogenea non si evidenzia la forma ad anello;
- Questa particolare distribuzione dipende da un'altro fattore indipendente dall'ossigeno: il pH.

Il gradiente di pH viene dimostrato tramite un indicatore di  $\text{pH}_i$ , la cui intensità di fluorescenza consente la valutazione del pH nelle cellule. L'intensità di fluorescenza appare dopo circa 60 minuti dal posizionamento del vetrino su quasi tutta la zona interna, ma non nei pressi del bordo (Figura 3.3). Questo

indica che vi è stato un incremento di ioni  $H^+$  all'interno delle cellule e di conseguenza una diminuzione del  $pH_i$ .

A tal proposito è necessario fare una precisazione: il  $pH_i$  non è necessariamente uguale al pH del terreno di coltura. Alcuni studi dimostrano che, specialmente *in vitro*, il  $pH_i$  è, in una certa misura, concorde con il pH del mezzo di coltura [Michl et al. [2019]]. Dunque, in [Honda et al. [2021]] si valuta solo l'andamento del  $pH_i$  modificando il pH del terreno di coltura.

Studi ulteriori con mezzi di coltura caratterizzati da pH nell'intervallo [5, 8.5] permettono di rivelare l'effetto del pH sulla formazione dell'anello di espressione di HIF, in particolare: l'anello è chiaramente visibile per pH 8.5 e pH 7.4; risulta leggermente oscurato, ma ancora visibile per pH 6.5 mentre il segnale di HIF è totalmente oscurato per pH 5. In Figura 3.4 a sinistra viene rappresentata un'analisi quantitativa della posizione dell'anello, interno ed esterno, al variare del pH di coltura, mentre a destra viene data una rappresentazione grafica dei risultati ottenuti mediante l'immunoistochimica.

In mancanza di informazioni quantitative, si suppone che un possibile andamento del gradiente di pH all'interno del dominio dell'Exp.I. è quello mostrato in Figura 3.5. Esso ha dunque un andamento esponenziale crescente rispetto alla distanza dal centro: sul bordo assume il valore iniziale del pH del terreno di coltura  $pH_b$ , ma diminuisce rapidamente raggiungendo valori più acidi ( $pH_0$  5), nelle zone più interne.

Una volta definito un possibile andamento per il gradiente di pH è necessario introdurre maggiori informazioni circa la dipendenza di HIF1 dal pH. In particolare in [Filatova et al. [2016]] viene dimostrato che l'ipossia e l'acidosi cooperano per aumentare l'espressione di HIF attraverso diversi meccanismi come discusso nella sezione 3.1. L'informazione chiave che fornisce Filanova et

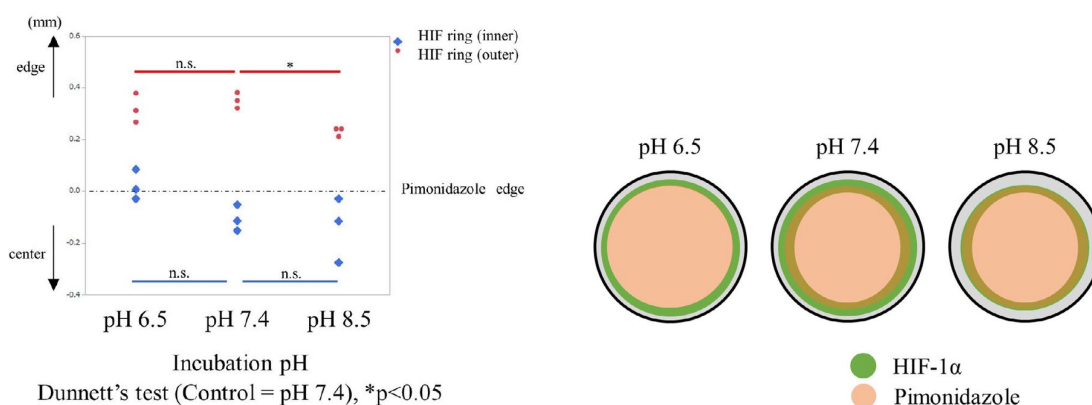


Figura 3.4: A sinistra, Analisi quantitativa localizzazione e spessore dell'anello di HIF nello studio di [Honda et al. \[2021\]](#). La coordinata zero rappresenta il bordo della zona positiva al pimonidazole. A destra, rappresentazione qualitativa dell'anello. [[Honda et al. \[2021\]](#)]

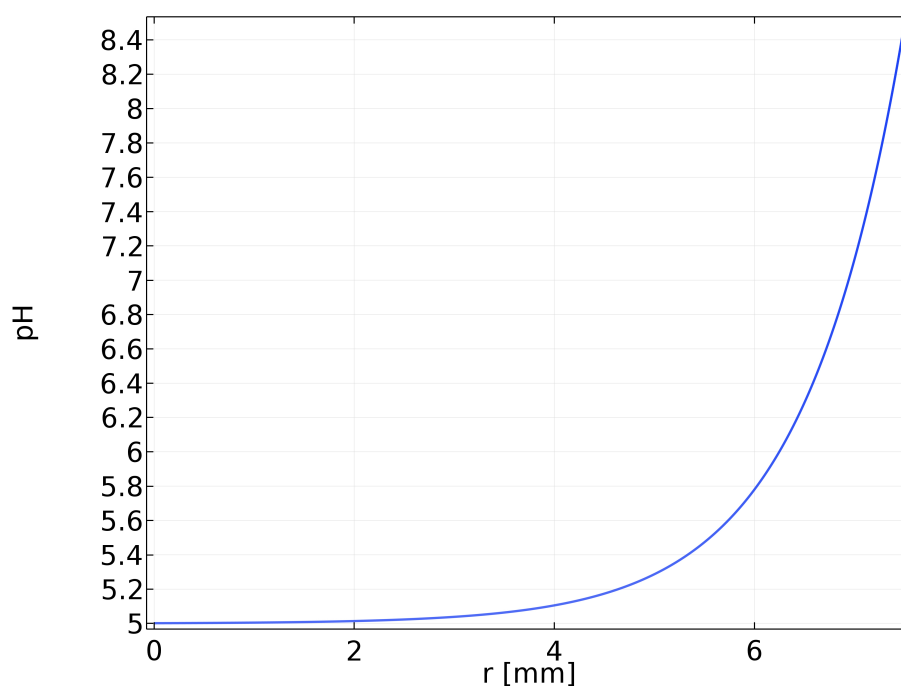


Figura 3.5: Possibile andamento del gradiente di pH lungo il dominio per un  $pH_b$  8.5.

al. è che un abbassamento del pH fino a un valore di circa 6.6-6.8 induce un aumento dell'espressione di HIF1 $\alpha$  e HIF2 $\alpha$ , sia in condizioni di normossia che ipossia, mentre un ulteriore abbassamento del pH riduce l'espressione di HIF $\alpha$ . Questo suggerisce che l'andamento dell'espressione di HIF aumenta al diminuire del pH, ha un picco per pH 6.8 e poi diminuisce sensibilmente per valori più acidi fino quasi ad annullarsi.

A seguito di tali considerazioni si procede definendo  $\delta_{pH}$ , un nuovo tasso di degradazione di HIF1 dipendente dal pH che sia minimo per valori di pH centrati attorno a 6.7 e che aumenti sia per pH più acidi sia per pH più basici. Questo è definito mediante l'inverso di una distribuzione gaussiana. Dunque il nuovo tasso di degradazione di HIF, rappresentato in Figura 3.6, sarà:

$$\delta_{pH}(pH) = \delta_1 \cdot e^{2(pH-6.7)^2} \quad (3.11)$$

A questo punto si procede effettuando delle simulazioni numeriche del modello matematico di evoluzione temporale della dinamica HIF1-PHD2 così definito:

$$\begin{cases} \frac{dH_1}{dt} = \gamma_1 - \delta_{pH}(pH)H_1 - \delta_{12}^{ox} g_{12}(O_2)F_{12}(H_1) P_2 \\ \frac{dP_2}{dt} = \Gamma_2(H_1) - \delta_{P_2}P_2 \end{cases} \quad (3.12)$$

dove la concentrazione di ossigeno  $O_2$  è descritta dall'equazione (2.12).

Per riassumere, sulla base delle considerazioni fatte è stato scelto un andamento del gradiente di pH di tipo esponenziale crescente rispetto alla distanza dal centro che tende a pH 5 nella zona di maggiore ipossia, cioè al centro della coltura cellulare, mentre è stata definita una funzione per il tasso di degradazione di HIF  $\delta_{pH}(pH)$  pari all'inverso di una gaussiana centrata in pH = 6.7.

Verrà infine effettuato uno studio sulla posizione e l'intensità dell'anello al variare del pH iniziale della coltura e dei parametri del modello.

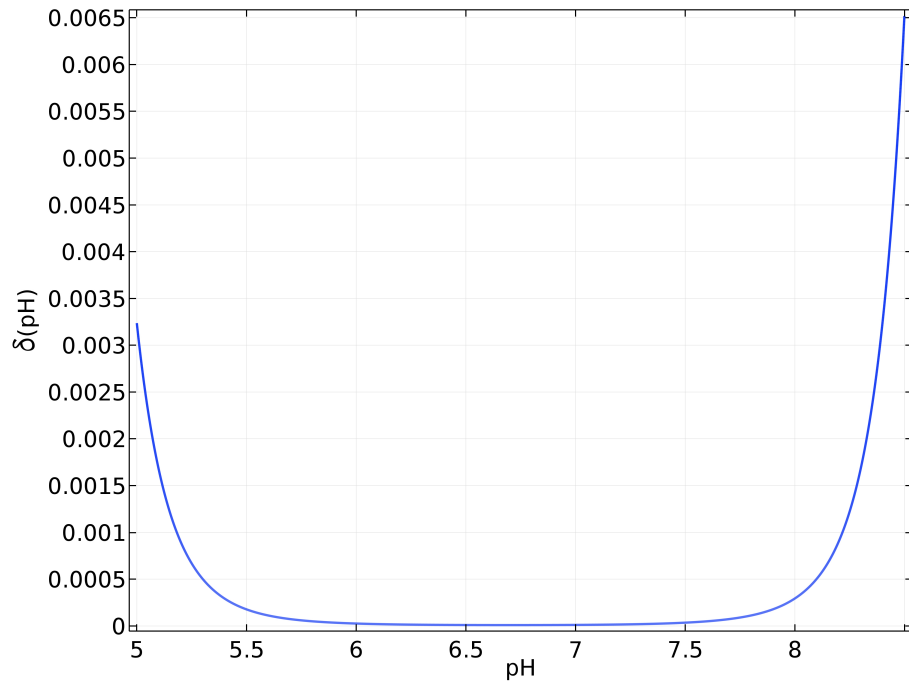


Figura 3.6: Tasso di degradazione di HIF1 in funzione del pH

### 3.2.1 Simulazioni numeriche

In questa sezione verranno discusse le simulazioni numeriche effettuate per ottenere la particolare distribuzione di HIF1 osservata nell'Exp I [Honda et al. [2021]].

In particolare, si risolve il sistema di equazioni alle derivate ordinarie (3.12) utilizzando la distribuzione di ossigeno ottenuta numericamente con il set-up dell'Exp I risolto in geometria 2D assialsimmetrica (Simulazione 2) descritto nel paragrafo 2.4.1. In questo modo si ricava l'evoluzione spazio temporale di HIF1 e PHD2 all'interno della coltura cellulare.

I parametri di partenza, utili per l'implementazione di tali equazioni nel modello in Comsol, sono riportati nella tabella 3.1.

Si definisce la seguente funzione esponenziale che descrive l'andamento del pH



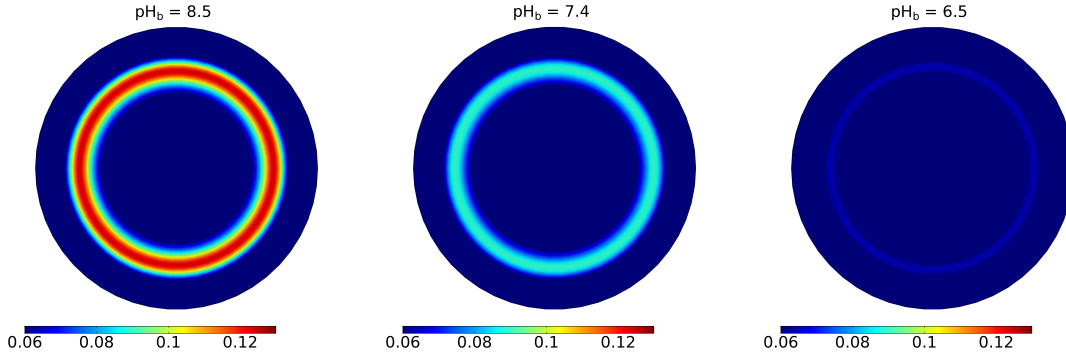


Figura 3.7: Soluzioni delle simulazioni numeriche della funzione  $H_1$  per tre valori di  $\text{pH}_b$  al bordo con distribuzione data da (3.13) allo stato stazionario.

lungo il dominio:

$$\text{pH}(r) = 5 + a e^{r-7.5} \quad (3.13)$$

In particolare si definiscono tre gradienti di pH esponenziale al variare del parametro  $a$  che definisce  $\text{pH}_b$ , cioè il pH al bordo. In tutti e tre i casi, il pH al centro della coltura tende ad un  $\text{pH}_0$  5.

Si effettua dunque uno studio stazionario del modello così definito per tre valori di  $\text{pH}_b$ , rispettivamente 8.5, 7.4 e 6.5, di cui vengono mostrati i risultati in Figura 3.7. L'anello di HIF1 risulta notevolmente più marcato per valori di  $\text{pH}_b$  8.5 e 7.4, mentre risulta meno evidente, ma ancora visibile per  $\text{pH}_b$  6.5, in accordo con quanto riportato in [Honda et al. \[2021\]](#).

Inoltre, in Figura 3.8, a sinistra viene rappresentato l'andamento dell'espressione di HIF1 lungo la sezione trasversale del dominio, in particolare lungo la retta  $z = h/2$ , mentre nel grafico di destra, viene riportata la posizione dell'anello HIF1 al variare del  $\text{pH}_b$ , avendo fissato un valore di concentrazione limite di HIF pari a  $0.06 \text{ mol/m}^3$  sotto il quale l'anello non risulta più visibile. Da quest'ultimo grafico, si può notare come l'anello di HIF1 tende a restringersi per range di pH più alcalini, in particolare l'anello interno tende a spostarsi

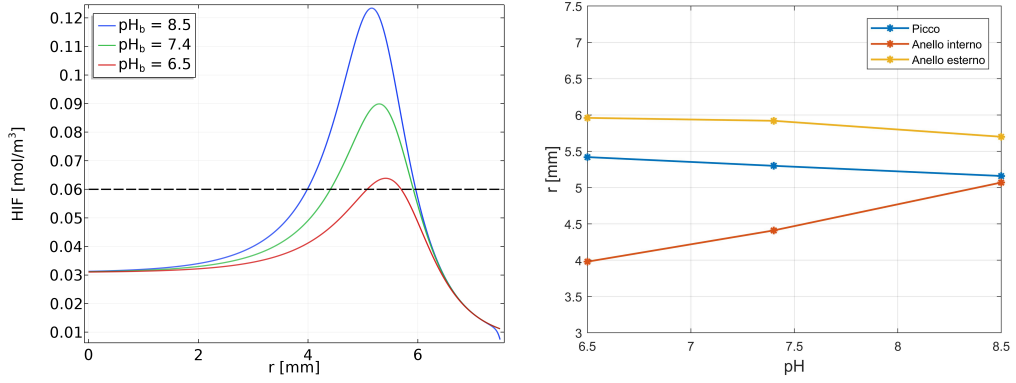


Figura 3.8: A sinistra, Andamento dell'espressione di HIF1 lungo  $r$  in  $z = h/2$  allo stato stazionario per i tre valori di  $\text{pH}_b$ . A destra, grafico in cui viene riportata la posizione dell'anello al variare del  $\text{pH}_b$ .

verso l'esterno, mentre quello esterno tende a spostarsi verso l'interno, anche se in maniera meno marcata.

Dopo aver fatto uno studio sulla posizione dell'anello al variare del  $\text{pH}_b$  al bordo, si fissa un  $\text{pH}_b$  8.5, e si effettua uno studio della posizione dell'anello al variare degli altri parametri presenti nel modello, in particolare si definiscono i seguenti valori per i rispettivi parametri:

- $\gamma_1 = 0.5 - 1 - 1.667 - 2 - 2.5 - 3 \mu\text{M/s}$ ;
- $\delta_1 = 10^{-4} - 1.667 \cdot 10^{-4} - 3 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-4} - 7 \cdot 10^{-4} - 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ;
- $\delta_{12}^{ox} = 0.5 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-1} - 1.667 \cdot 10^{-1} - 2.5 \cdot 10^{-1} - 3.5 \cdot 10^{-1} - 4.5 \cdot 10^{-1} - 6.5 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;
- $\gamma_{21} = 1.68 \cdot 10^{-4} - 2.68 \cdot 10^{-4} - 3.68 \cdot 10^{-4} - 6.68 \cdot 10^{-4} - 9.68 \cdot 10^{-4} - 1.268 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ;
- $\delta_{P_2} = 10^{-4} - 1.667 \cdot 10^{-4} - 3 \cdot 10^{-4} - 5.5 \cdot 10^{-4} - 7.5 \cdot 10^{-4} - 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .

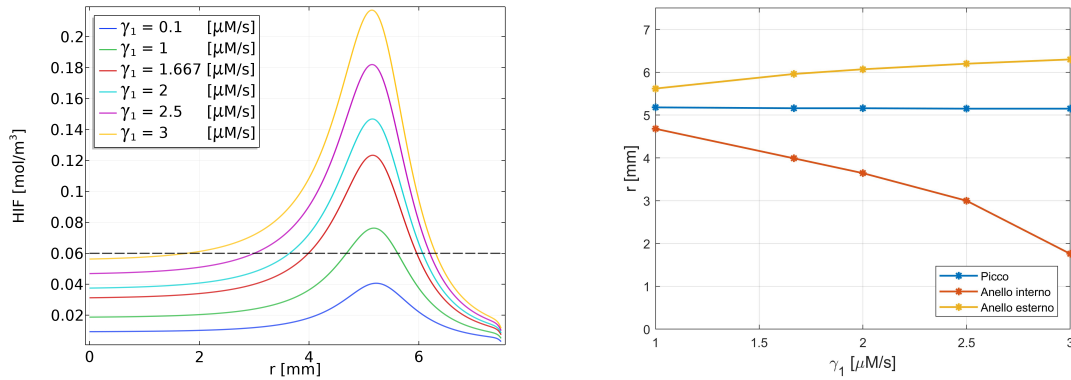


Figura 3.9: A sinistra, Andamento dell'espressione di HIF1 lungo  $r$  in  $z = h/2$  allo stato stazionario per diversi valori di  $\gamma_1$ . A destra, grafico in cui viene riportata la posizione dell'anello al variare di  $\gamma_1$ .

Si effettua dunque uno studio stazionario per ogni parametro sopraccitato e per ogni valore assegnato a tale parametro, si studia la posizione dell'anello HIF1.

In Figura 3.9, a sinistra, viene rappresentato l'andamento dell'espressione di HIF1 lungo la sezione trasversale del dominio, in particolare lungo la retta  $z = h/2$ , per i diversi valori assegnati a  $\gamma_1$ , tasso di produzione di base di HIF1. Nel grafico destra di Figura 3.9, viene invece riportata la posizione dell'anello HIF1 al variare di  $\gamma_1$ , avendo fissato un valore di concentrazione limite di HIF pari a  $0.06 \text{ mol/m}^3$  sotto il quale l'anello non risulta più visibile. Da tali grafici si può notare che tanto più grande è il tasso di produzione, tanto maggiore sarà l'intensità dell'anello. Questo inoltre tende ad espandersi di più verso l'interno che verso l'esterno, mentre la posizione del picco rimane pressoché invariata al variare di  $\gamma_1$ . Infine, per  $\gamma = 0.1 \mu\text{M/s}$  l'anello HIF1 non risulta visibile.

In Figura 3.10, a sinistra, viene rappresentato l'andamento dell'espressione di HIF1 lungo la sezione trasversale del dominio, in particolare lungo la retta  $z = h/2$ , per i diversi valori assegnati a  $\delta_1$ , tasso di degradazione naturale di

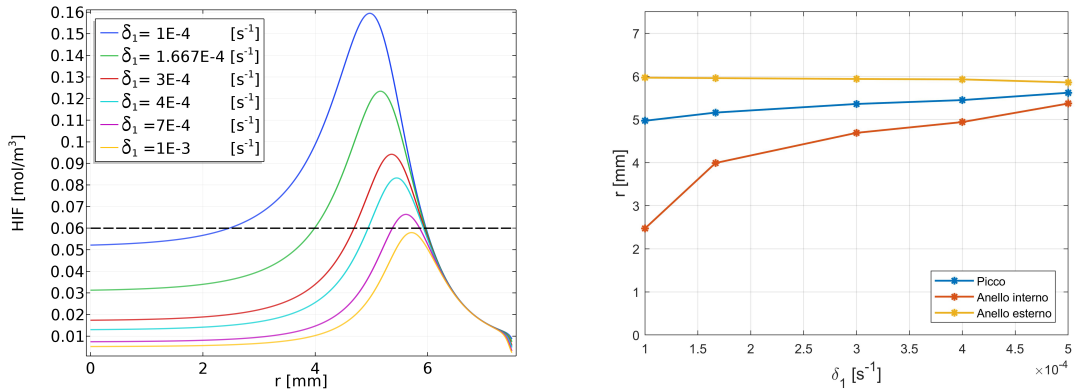


Figura 3.10: A sinistra, Andamento dell'espressione di HIF1 lungo  $r$  in  $z = h/2$  allo stato stazionario per diversi valori di  $\delta_1$ . A destra, grafico in cui viene riportata la posizione dell'anello al variare di  $\delta_1$ .

HIF1. Nel grafico di destra in Figura 3.10, viene invece riportata la posizione dell'anello HIF1 al variare di  $\delta_1$ , avendo fissato un valore di concentrazione limite di HIF1 pari a  $0.06 \text{ mol/m}^3$  sotto il quale l'anello non risulta più visibile. Da tali grafici si nota che tanto più aumenta il tasso di degradazione, tanto meno risulterà visibile l'anello. In particolare, esso tende a restringersi, ma a differenza di prima, la posizione del picco di espressione di HIF1, non rimane invariata, ma tende a spostarsi verso l'esterno. La posizione dell'anello esterno infatti rimane pressoché invariata, a differenza dell'anello interno che invece tende a muoversi verso l'esterno.

In Figura 3.11, a sinistra, viene rappresentato l'andamento dell'espressione di HIF1 lungo la sezione trasversale del dominio, in particolare lungo la retta  $z = h/2$ , per i diversi valori assegnati a  $\delta_{12}^{ox}$ , tasso di degradazione di HIF1 da parte di PHD2. Nel grafico di destra in Figura 3.11, viene invece riportata la posizione dell'anello HIF1 al variare di  $\delta_{12}^{ox}$ , avendo fissato un valore di concentrazione limite di HIF1 pari a  $0.06 \text{ mol/m}^3$  sotto il quale l'anello non risulta più visibile. Da questi grafici si deduce che tanto più aumenta  $\delta_{12}^{ox}$ , tanto meno sarà espresso

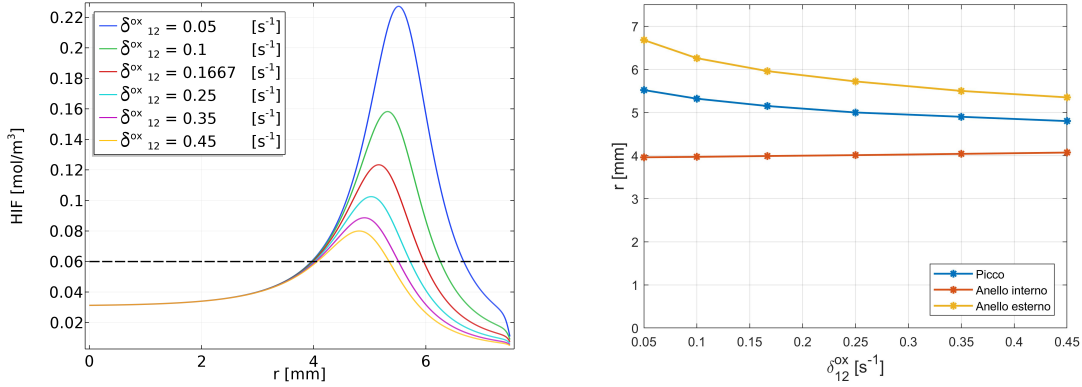


Figura 3.11: A sinistra, Andamento dell'espressione di HIF1 lungo  $r$  in  $z = h/2$  allo stato stazionario per diversi valori di  $\delta_{21}^{ox}$ . A destra, grafico in cui viene riportata la posizione dell'anello al variare di  $\delta_{21}^{ox}$ .

l'anello di HIF1. In particolare l'anello esterno tende a spostarsi verso l'interno del provino, mentre l'anello interno rimane invariato.

In Figura 3.12, a sinistra, viene rappresentato l'andamento dell'espressione di HIF1 lungo la sezione trasversale del dominio, in particolare lungo la retta  $z = h/2$ , per i diversi valori assegnati a  $\gamma_{21}$ , tasso di produzione di PHD2. Nel grafico di destra in Figura 3.12, viene invece riportata la posizione dell'anello HIF1 al variare di  $\gamma_{21}$ , avendo fissato un valore di concentrazione limite di HIF1 pari a  $0.06 \text{ mol/m}^3$  sotto il quale l'anello non risulta più visibile. Si nota che, per valori crescenti di  $\gamma_{21}$  l'espressione di HIF1 tende a diminuire e dunque l'anello tende a restringersi. In particolare l'anello esterno tende a spostarsi verso l'interno, mentre l'anello interno rimane invariato. Infine, in Figura 3.13, a sinistra, viene rappresentato l'andamento dell'espressione di HIF1 lungo la sezione trasversale del dominio, in particolare lungo la retta  $z = h/2$ , per i diversi valori assegnati a  $\delta_{P_2}$ , tasso di degradazione naturale di PHD2. Nel grafico di destra in Figura 3.13, viene invece riportata la posizione dell'anello HIF1 al variare di  $\delta_{P_2}$ , avendo fissato un valore di concentrazione limite di HIF1

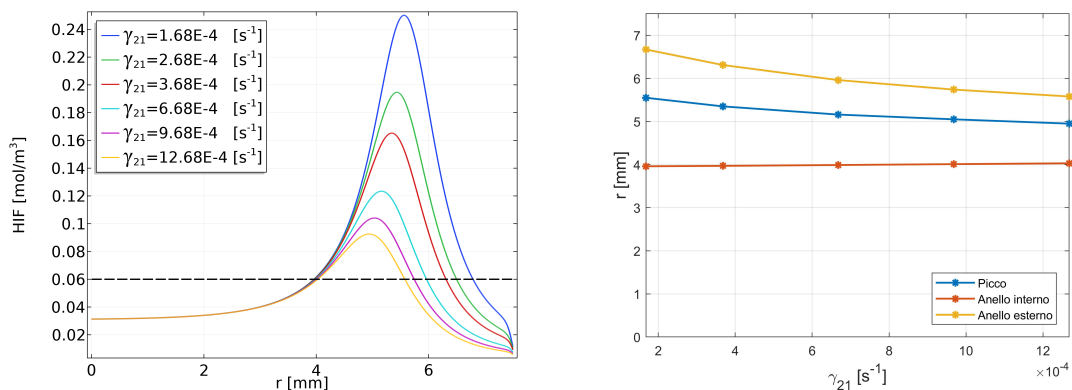


Figura 3.12: A sinistra, Andamento dell'espressione di HIF1 lungo  $r$  in  $z = h/2$  allo stato stazionario per diversi valori di  $\gamma_{21}$ . A destra, grafico in cui viene riportata la posizione dell'anello al variare di  $\gamma_{21}$ .

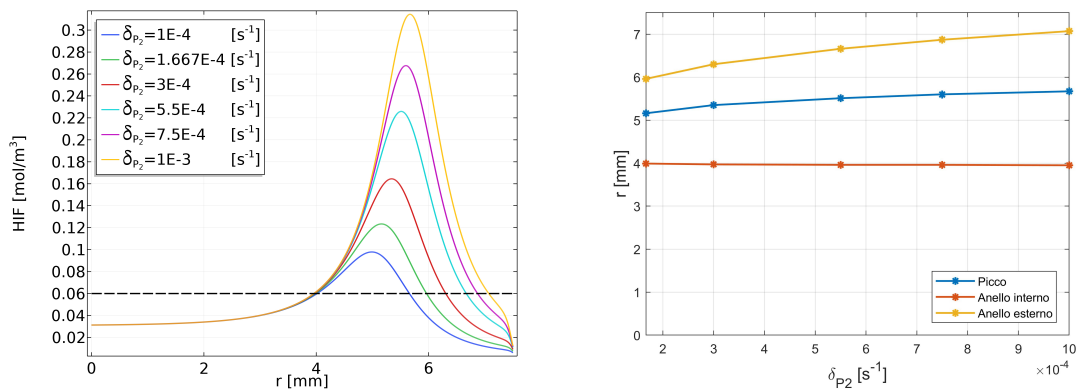


Figura 3.13: A sinistra, Andamento dell'espressione di HIF1 lungo  $r$  in  $z = h/2$  allo stato stazionario per diversi valori di  $\delta_{P_2}$ . A destra, grafico in cui viene riportata la posizione dell'anello al variare di  $\delta_{P_2}$ .

pari a  $0.06 \text{ mol/m}^3$  sotto il quale l'anello non risulta più visibile. Si nota che, tanto più alto è il tasso di degradazione di PHD2 tanto meno l'anello HIF1 risulta espresso. Il bordo esterno tende a restringersi verso l'interno, e anche il picco tende a muoversi verso l'interno. L'anello interno invece rimane invariato.

# Bibliografia

COMSOL Multiphysics. <https://www.comsol.com/>.

Milton Abramowitz, Irene A Stegun, and Robert H Romer. Handbook of mathematical functions with formulas, graphs, and mathematical tables, 1988.

Rebecca J Appelhoff, Ya-Min Tian, Raju R Raval, Helen Turley, Adrian L Harris, Christopher W Pugh, Peter J Ratcliffe, and Jonathan M Gleadle. Differential function of the prolyl hydroxylases phd1, phd2, and phd3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37):38458–38465, 2004.

Miguel Arocena, Mercedes Landeira, Andrés Di Paolo, Alejandro Silva, José Sotelo-Silveira, Ariel Fernández, and Julia Alonso. Using a variant of coverslip hypoxia to visualize tumor cell alterations at increasing distances from an oxygen source. *Journal of cellular physiology*, 234(10):16671–16678, 2019.

Johanna Chiche, M Christiane Brahimi-Horn, and Jacques Pouyssegur. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4):771–794, 2010.

Cyril Corbet and Olivier Feron. Tumour acidosis: from the passenger to the driver’s seat. *Nature Reviews Cancer*, 17(10):577–593, 2017.

Holger K Eltzschig and Peter Carmeliet. Hypoxia and inflammation. *New England Journal of Medicine*, 364(7):656–665, 2011.

Ferrante, P, and Preziosi. Modelling hif-phd dynamics and related downstream pathways. *Mathematical models and computer simulations for biomedical applications*, 2023.

Alina Filatova, Sascha Seidel, Nuray Böğürçü, Sabine Gräf, Boyan K Garvalov, and Till Acker. Acidosis acts through hsp90 in a phd/vhl-independent

- manner to promote hif function and stem cell maintenance in gliomaacidosis promotes hif and glioma stem cells. *Cancer research*, 76(19):5845–5856, 2016.
- Yosuke Hirakawa, Kiichi Mizukami, Toshitada Yoshihara, Ippei Takahashi, Purevsuren Khulan, Tomoko Honda, Imari Mimura, Tetsuhiro Tanaka, Seiji Tobita, and Masaomi Nangaku. Intravital phosphorescence lifetime imaging of the renal cortex accurately measures renal hypoxia. *Kidney International*, 93(6):1483–1489, 2018.
- Tomoko Honda, Yosuke Hirakawa, Kiichi Mizukami, Toshitada Yoshihara, Tetsuhiro Tanaka, Seiji Tobita, and Masaomi Nangaku. A distinctive distribution of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in cultured renal tubular cells with hypoperfusion simulated by coverslip placement. *Physiological reports*, 9(1):e14689, 2021.
- Bing-Hua Jiang, Elizabeth Rue, Guang L Wang, Rick Roe, and Gregg L Semenza. Dimerization, dna binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30):17771–17778, 1996.
- Yi Jiang, Jelena Pjesivac-grbovic, Y Charles Cantrell, and James P Freyer. A multiscale model for avascular tumor growth, biophys. In *J. Citeseer*, 2005.
- Joseph Leedale, Anne Herrmann, James Bagnall, Andreas Fercher, Dmitri Papkovsky, Violaine Sée, and Rachel N Bearon. Modeling the dynamics of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (hif-1 $\alpha$ ) within single cells and 3d cell culture systems. *Mathematical biosciences*, 258:33–43, 2014.
- Steffi Lehmann, Veronika Te Boekhorst, Julia Odenthal, Roberta Bianchi, Sjoerd van Helvert, Kristian Ikenberg, Olga Ilina, Szymon Stoma, Jael Xandry, Liying Jiang, et al. Hypoxia induces a hif-1-dependent transition from collective-to-amoeboid dissemination in epithelial cancer cells. *Current Biology*, 27(3):392–400, 2017.
- Johanna Michl, Kyung Chan Park, and Pawel Swietach. Evidence-based guidelines for controlling ph in mammalian live-cell culture systems. *Communications biology*, 2(1):144, 2019.
- Wolfgang Mueller-Klieser. Tumor biology and experimental therapeutics. *Critical reviews in oncology/hematology*, 36(2-3):123–139, 2000.
- Megan L Rexus-Hall, Jalees Rehman, and David T Eddington. A microfluidic oxygen gradient demonstrates differential activation of the hypoxia-regulated



transcription factors hif-1 $\alpha$  and hif-2 $\alpha$ . *Integrative Biology*, 9(9):742–750, 2017.

Einar K Rofstad, Berit Mathiesen, Kristil Kindem, and Kanthi Galappathi. Acidic extracellular ph promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer research*, 66(13):6699–6707, 2006.

Paul Trayhurn. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiological reviews*, 93(1):1–21, 2013.

Daniel Zwillinger and Alan Jeffrey. *Table of integrals, series, and products*. Elsevier, 2007.