

---

ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI  
BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA  
DIPARTIMENTO DI  
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E  
DELL'INFORMAZIONE  
"GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN  
INGEGNERIA BIOMEDICA

CHEMIOTERAPIA AUTOMATIZZATA:  
SISTEMI DI CONTROLLO  
IN RETROAZIONE  
PER L'ANALISI DELLA  
CRESCITA TUMORALE SECONDO  
IL MODELLO A DERIVATE  
FRAZIONARIE

Elaborato in  
Controlli automatici

---

RELATORE:  
Prof.  
Paolo Castaldi

A CURA DI:  
Matteo Peverati

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



# Indice

<b>Abstract</b>	<b>1</b>
<b>1 Introduzione</b>	<b>2</b>
<b>2 Basi teoriche</b>	<b>6</b>
2.1 Basi di calcolo frazionario . . . . .	6
2.2 Sistemi di controllo in retroazione . . . . .	10
2.3 Sistema immunitario e cellule tumorali . . . . .	15
<b>3 Modelli e metodi</b>	<b>19</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>35</b>



# Abstract

L'immunoterapia è una delle tecniche più all'avanguardia per la lotta contro il cancro e si basa sull'aumento delle prestazioni del sistema immunitario attraverso anticorpi monoclonali (ovvero farmaci immunoterapici). Grazie a questi, la terapia garantisce l'inibizione dei checkpoint immunologici, che permettono alle cellule del sistema immunitario di riconoscere la presenza del tumore e aggredirlo fino a eradicarlo. La tesi propone una soluzione frazionaria al problema della crescita tumorale, basandosi su un modello di Kuznetsov esteso dove viene presa in considerazione anche il parametro di concentrazione di Interleuchina-2. Tramite un'analisi di stabilità del modello proposto è possibile arrivare a un valore di  $\sigma$ , ovvero il rateo di cellule effettrici entrante nel compartimento, per il quale il sistema delle cellule tumorali viene completamente eradicato. Una volta trovata la condizione di stabilità e calcolato il valore di  $\alpha$  (ordine della derivata frazionaria) che approssima al meglio la crescita tumorale nel caso reale, viene proposto un sistema di controllo automatico in retroazione basato sul numero di cellule effettrici per automatizzare il processo immunoterapico.

# Capitolo 1

## Introduzione

I sistemi di controllo automatici biologici sono processi fondamentali alla base del meccanismo della vita di qualsiasi organismo vivente. Il nostro corpo, come quello di tutti gli esseri viventi, invia continuamente segnali di tipo chimico, molecolare ed elettrico ai fini di regolare automaticamente i processi biologici. Questa attività prende il nome di meccanismo di retroazione, ed è alla base di numerosi processi di regolazione interna, uno fra tutti l'omeostasi.

Il primo a interessarsi a quelle che al giorno d'oggi possono essere considerate le basi della cibernetica applicata alla biologia, è stato il fisiologo francese Claude Bernard, il quale comprese che alcune dinamiche del nostro corpo funzionavano secondo un meccanismo di autoregolazione. [1]

Il concetto venne successivamente analizzato e ampliato dal fisiologo americano Walter Cannon, con la sua opera "The wisdom of the body", nel 1932. L'autore, nello scritto, presentò la descrizione di numerosi sistemi di controllo presenti negli esseri viventi e diede una prima definizione del concetto di omeostasi: "tutte quelle reazioni fisiologiche coordinate che mantengono la massima parte degli stati stazionari dell'organismo". [1]

Il concetto introdotto da Cannon venne poi rielaborato nel 1947 da Norbert Wiener nell'opera "La cibernetica: controllo e comunicazione nell'animale e nella macchina", che venne poi presa come riferimento da numerosi ricercatori. Nel suo scritto, Wiener affianca i sistemi di controllo automatici biologici presenti nel nostro corpo a quelli che dovrebbero essere presenti all'interno di alcuni elaboratori informatici. [2]

Il matematico statunitense pose prima l'attenzione sul comportamento umano, in particolare sull'apprendimento, in modo da rendere il calcolatore sempre più simile a un essere pensante. Nell'ultimo capitolo Wiener affronta quello che effettivamente racchiude il fulcro del suo libro, ovvero i sistemi auto-organizzanti, prendendo come riferimento le onde cerebrali. Lo scrittore

dopo una discussione sulle limitazioni tecniche dei primi elettroencefalografici descrive una procedura basata sui risultati dei suoi lavori sulla funzione di autocorrelazione e sull'analisi armonica per i processi aleatori, al fine di calcolare la densità spettrale dell'elettroencefalogramma. Successivamente Wiener analizza le modalità con le quali i neuroni del cervello possano sincronizzarsi per produrre una frequenza comune, detta ritmo alfa.

Grazie al suo enorme apporto al mondo della teoria dell'informazione, Wiener viene riconosciuto come padre della cibernetica moderna, ma anche come la prima persona a introdurre il concetto di controllo automatico.

Gli studi di Wiener vennero declinati in vari modi e da molteplici studiosi e matematici dell'epoca, i quali introdussero il concetto di sistema naturale e biologico come un organismo in grado di autoregolarsi al fine di sopravvivere. Al giorno d'oggi gli scienziati stanno cercando di ampliare il concetto base fornito da Wiener attraverso modelli matematici, in modo da poter prevedere determinati eventi e fornire conseguenti meccanismi correttivi.

Questi studi ci permetterebbero di fare grossi passi avanti nell'ambito della biologia molecolare. Se riuscissimo a comprendere a fondo questi meccanismi, potremmo fornire una rappresentazione semplificata di problemi fino ad adesso ritenuti un'incognita.

Una delle grandi innovazioni che potrebbe essere introdotta, riguarda la comprensione delle meccaniche relative alla crescita tumorale e all'angiogenesi. Sin dalla loro scoperta, le cellule tumorali si sono presentate come una grande sfida per il mondo della medicina, in particolare riguardo allo studio della loro crescita. Un più chiaro quadro su questo argomento è stato fornito nel 2000, quando Douglas Hanahan e Robert Weinberg pubblicarono "The Hallmarks of Cancer" [3], uno scritto che permise di evidenziare in modo più chiaro le differenze fra le cellule cancerose e quelle sane, gettando così le basi per le successive ricerche nel settore.

Le cellule tumorali possono colpire il nostro organismo in modo completamente differente in base a diversi parametri, ciò quindi richiede un approccio e tempi di cura specifici per ogni tipo di tumore. Col passare degli anni sono stati scoperti diversi metodi di trattamento delle cellule tumorali, come la chirurgia, la radioterapia, la chemioterapia e l'immunoterapia. Quest'ultima, nonostante sia una delle più recenti terapie per la lotta contro il cancro, ha avuto origine nel 1798 grazie a Edward Jenner, medico e naturalista britannico noto per aver ideato il vaccino contro il vaiolo. Ad oggi, è lui a essere considerato il padre dell'immunologia. Da allora si sono susseguite una serie di scoperte sul nostro sistema immunitario e sugli anticorpi presenti nel nostro organismo che hanno portato a consapevolezze e progressi scientifici sempre maggiori.

I primi che riuscirono ad affiancare le conoscenze sulle cellule tumorali a quelle

sul sistema immunitario, furono James P. Allison e Tasuku Honjo, che ricevettero il premio Nobel per la medicina nel 2018. Negli anni recenti, il concetto di immunoterapia è stata ulteriormente ampliata, soprattutto relazionandolo ad altri metodi di trattamenti antitumorali come la chemioterapia.

L'obiettivo di questa tesi è osservare il comportamento delle cellule tumorali in corrispondenza di un trattamento immunoterapico, analizzando attraverso grafici ed equazioni l'evoluzione del tumore e delle cellule del sistema immunitario. Questa analisi verrà eseguita attraverso un modello matematico a derivate frazionarie (operatore matematico introdotto nella seguente parte di basi teoriche), che ha la particolare caratteristica di avere memoria temporale. Attraverso questo modello possiamo avere una mappa dell'evoluzione completa nel tempo delle cellule tumorali e immunitarie. Questa informazione è unica e caratteristica dell'operatore frazionario.

Ottenuto il modello e quindi la mappa del processo evolutivo dei nostri bersagli, il progetto vero e proprio proposto nella tesi è un controllo automatico in retroazione che permetta di capire le migliori condizioni di stabilità del sistema tumorale ed effettuare un'azione correttiva in maniera tale che questa condizione venga sempre verificata.

Al momento, qualsiasi progetto di immunoterapia automatizzata è solamente teorico essendo un trattamento relativamente recente e dal quale si deve ancora estrarre il massimo delle potenzialità.

Questo tipo di sistema di controllo in retroazione è già stato simulato su un trattamento di tipo chemioterapico: tale studio ci permette di confrontare il modello ideato nella tesi, di tipo prettamente compilativo, con risultati elaborati tramite simulazione.

Il modello preso in considerazione si basa sulla teoria del controllo ottimo e progetta un sistema di iniezione del farmaco chemioterapico in maniera automatizzata basandosi su segnali biologici derivanti dal ciclo cellulare. In particolare, viene riportato che somministrando il farmaco durante la mitosi, l'effetto desiderato sarà ampliato, in quanto durante tale fase, la cellula diventa più sottile e porosa, e inoltre preverremo la duplicazione e quindi lo sviluppo tumorale.

Attraverso la simulazione possiamo osservare l'andamento della popolazione tumorale prima e dopo l'iniezione di farmaco, in modo da poter evidenziare l'efficacia del trattamento. In Figura 1.1 è possibile notare come nella fase  $G_0$ , questo tipo di chemioterapia permetta una completa eradicazione delle cellule tumorali. [4]

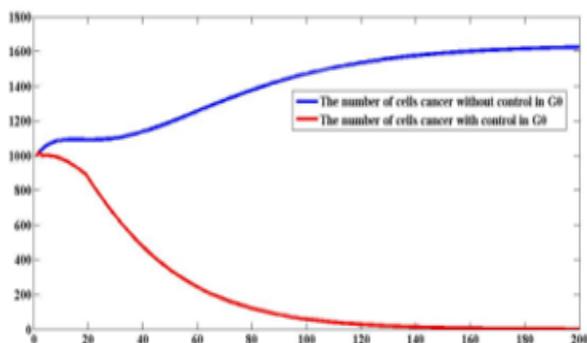


Figura 1.1: Grafico del numero di cellule tumorali nel tempo in caso di chemioterapia

Chemioterapia e immunoterapia nonostante si basino su due principi completamente differenti, sono molto legate tra di loro, tanto che la chemio-immunoterapia è un tipo di trattamento in fase di sviluppo che prometterà buoni risultati con grande efficacia.

Nonostante le grandi scoperte che ogni anno si susseguono nel mondo della medicina, non si è ancora arrivati a una soluzione chiara su come vincere la guerra contro il cancro. Molte tecnologie, come la chemio-immunoterapia, sono ancora in fase di sperimentazione e le ricerche progrediscono in continuazione, per questo molte terapie automatizzate al giorno d'oggi restano puramente concetti teorici e simulativi.

È da riportare però come un primo approccio tra i mondi delle terapie contro il cancro e i sistemi automatici sia già avvenuto per merito di diverse aziende, le quali hanno progettato un macchinario che permette di calcolare automaticamente l'ottimale mix di farmaci chemioterapici e la dose corretta da iniettare al paziente [5]. Questo tipo di automazione, negli ospedali aumenterebbe moltissimo l'efficacia e la qualità delle cure, oltre che la sicurezza e la precisione per quanto riguarda i farmaci chemioterapici.

# Capitolo 2

## Basi teoriche

### 2.1 Basi di calcolo frazionario

Nella tesi viene approfondito un approccio al problema della crescita tumorale attraverso modelli matematici usanti calcolo frazionario.

Il concetto di calcolo frazionario venne introdotto nel 1695 dal matematico De l'Hopital, il quale in una lettera al suo collega Leibniz, domandò cosa sarebbe successo se nella definizione di derivata classica, l'ordine non fosse intero ma frazionario. [6]

Prendiamo ad esempio la funzione:

$$f(x) = x^n \tag{2.1}$$

Osservando i grafici della funzione in Figura 2.1, per  $n$  intero si può vedere in modo chiaro la differenza che c'è tra una derivata di ordine  $n$  e una di ordine  $n - 1$ . La transizione che c'è tra i due grafici lasciò pensare ai matematici che per valori decimali compresi tra  $n$  e  $n - 1$ , la funzione variasse tra le due rappresentazioni.

Il problema nacque nel momento in cui si osservò che una derivata frazionaria, analiticamente, non seguiva le leggi della matematica definite per le derivate intere.

Negli anni successivi numerosi matematici di fama mondiale come Eulero, Laplace, Fourier, Abel, Riemann, Liouville e lo stesso Leibniz, provarono a dare una spiegazione a questo problema, senza mai riuscirci, ma contribuendo indirettamente al suo sviluppo.

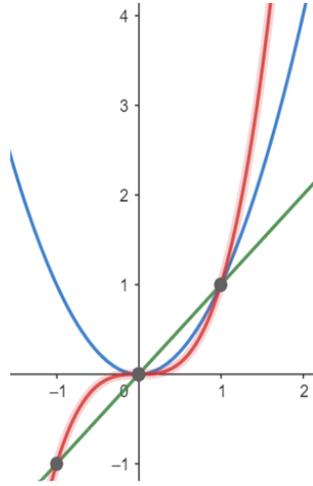


Figura 2.1: Andamento delle funzioni  $x^n$  per  $n = 1, 2, 3$ .

La prima versione ritenuta ufficiale di calcolo frazionario fu quella fornita da Riemann e Liouville, che venne successivamente rielaborata in vari modi. La definizione fornita dai due matematici per le derivate frazionarie nacque inizialmente cercando di dare una spiegazione agli integrali frazionari, e si presenta come una rielaborazione della formula di Cauchy per integrazioni ripetute, mostrata nella 2.1:

$${}_n \int_a^t f(x) dx^n = \frac{1}{(n-1)!} \int_a^t (t-x)^{n-1} f(x) dx \quad (2.2)$$

La formula viene apportata al calcolo frazionario nel caso in cui  $n = \frac{1}{2}$ , per il quale si verifica una situazione particolare. Andando ad analizzare il denominatore, si osserva che per  $n = \frac{1}{2}$  l'elemento del quale occorre calcolare il fattoriale è negativo, il che porta alla definizione della funzione Gamma:

$$\Gamma(x) = \int_0^\infty e^{-t} t^{x-1} dt, x \in \mathfrak{R}^+ \quad (2.3)$$

La funzione Gamma permette la rappresentazione fattoriale di ogni numero reale e ha alcune proprietà uniche espletate dalle seguenti formule:

$$\Gamma(x+1) = x\Gamma(x), x \in \mathfrak{R}^+ \quad (2.4)$$

$$\Gamma(x) = (x-1)! \quad (2.5)$$

Attraverso la relazione che lega derivata e integrale, possiamo definire la derivata di Riemann-Liouville attraverso il corrispettivo integrale:

$${}_p \int_a^t f(x) dx^p = \frac{1}{\Gamma(x)} \int_a^t (t-x)^{p-1} f(x) dx \quad (2.6)$$

$${}_a D_t^p = \left(\frac{d}{dt}\right)_a^t \int_a^t f(x) dx^\alpha \quad (2.7)$$

Dove  $p$  è l'ordine della derivata frazionaria e  $\alpha$  l'ordine dell'integrale frazionario, tale che  $p + \alpha = k$  intero. Impongo inoltre che l'ordine dell'integrale sia  $> 0$ , altrimenti divergerebbe e fornirebbe un valore infinito. [7]

Un'altra definizione di derivata frazionaria, partendo dalla formula di Riemann-Liouville, la possiamo ottenere scambiando l'operatore integrale e differenziale nella formula, ottenendo così:

$${}_a D_t^p = {}_a \int_a^t \left(\frac{d}{dt}\right)^k f(x) dx^\alpha \quad (2.8)$$

È stato verificato però che questa formula non fornisce lo stesso risultato della 2.7, in quanto la proprietà commutativa degli operandi non è verificata; quindi, l'ordine degli operatori è rilevante e può portare a risultati diversi. Questo vuol dire che non esiste un solo modo per definire le derivate frazionarie ma molteplici. La 2.8, ad esempio, prende il nome di derivata frazionaria di Caputo, ed è una delle più usate nel mondo del calcolo frazionario, nonché quella utilizzata in questa tesi nella parte di modelli e metodi.

La derivata ordinaria intera viene definita come un operatore locale, in quanto il suo valore in un determinato punto non cambia qualora la funzione non cambi nell'intorno del punto stesso. Al contrario quindi possiamo definire la derivata frazionaria come un operatore con memoria, in quanto il suo valore in un determinato punto cambia qualora la funzione subisca una variazione. Questa variazione può essere causata da un comportamento totalmente differente della funzione in qualsiasi punto del suo dominio, ma anche dalla variazione di un estremo del dominio. [8] Quest'ultima affermazione permette di capire come il valore della derivata frazionaria cambi qualora cambi l'intervallo in cui la funzione viene presa in considerazione. Se consideriamo una funzione definita nel dominio  $[-\infty ; +\infty]$ , derivata in un determinato punto in ordine frazionario, otterremo un valore diverso rispetto alla stessa funzione, derivata allo stesso ordine, ma con dominio  $[n , +\infty]$ ; dove  $n$  numero reale. Inoltre, più l'ordine frazionario della derivata si allontana dall'ordine intero, più l'informazione che la derivata frazionaria ci fornisce si distaccherà da quella che può fornire quella di ordine intero.

Graficando una qualsiasi funzione  $f(x)$  derivata all'ordine  $n$ , e le funzioni  $f(x)$  derivate all'ordine  $n - \varepsilon$  (dove  $\varepsilon$  un numero frazionario  $< 1$ ) si osserva come queste ultime abbiano un comportamento diverso in base al variare della funzione nel tempo. In particolare, facendo riferimento alla Figura 2.2,

la curva nera rappresenta una funzione  $y(t)$  di ordine 1 e quella rossa una funzione  $y(t)$  di ordine 0,1. Si può notare che più l'ordine si avvicina a 1, più la funzione  $y(t)$  tende alla funzione di riferimento di ordine 1. [6]

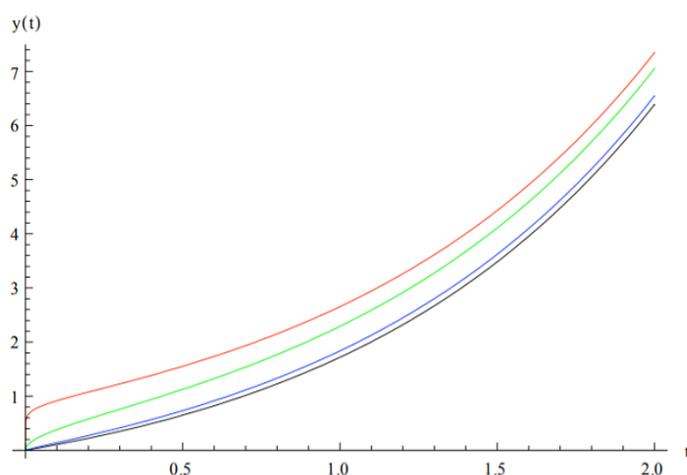


Figura 2.2: Derivate frazionarie con ordine crescente

La proprietà di questo operatore che fornisce grande innovazione soprattutto in ambito medico riguarda il cambiamento del valore della funzione al variare del limite inferiore del dominio, nel nostro caso il tempo. Questo vuol dire che se analizzassimo un fenomeno con una visione più ampia nel tempo, potremmo avere informazioni differenti rispetto a quelle che otterremmo se analizzassimo il fenomeno nel suo recente passato. Questa particolare caratteristica si applica in modo eccezionale allo studio delle cellule tumorali in quanto possiamo avere numerose informazioni sulla vita delle stesse semplicemente analizzando il sistema per tempi via via più remoti. Inoltre, anche cambiando l'ordine frazionario di analisi del modello possiamo ottenere informazioni differenti, più o meno simili ai casi di riferimento, ovvero i valori interi. Un sistema può essere analizzato attraverso diversi ordini, fino a trovare quello che meglio descrive il caso reale.

Le derivate frazionarie hanno un'applicazione molto più estesa della sola oncologia: il loro utilizzo sta crescendo sempre più per problemi di tipo clinico, economico, finanziario, gestionale, . . .

## 2.2 Sistemi di controllo in retroazione

Il concetto introdotto di derivata frazionaria può essere un'ottima implementazione ai sistemi di controllo automatico in quanto, avendo memoria del passato, permette di analizzare lo stato del sistema in un determinato istante di tempo. Questa informazione risulta di fondamentale importanza relativamente al concetto di controllo in retroazione (feedback), definito come una risposta a un sistema dinamico che influenza la continua attività o produttività del sistema. In biologia, il meccanismo di retroazione ha il compito di iniziare o inibire un determinato processo biologico. Le due modalità di funzionamento di questa attività sono definite dai due tipi di sistemi in retroazione che possono esistere: a controllo positivo o a controllo negativo. Nel primo caso la correzione introdotta lavora nella stessa direzione del flusso dei dati, ottenendo quindi l'accelerazione di un determinato processo già presente nel momento in cui si verifica il controllo; un esempio di controllo positivo è il rilascio di ormoni ossitocina, presenti nella donna durante la fase di parto e responsabili della stimolazione delle contrazioni. Il secondo tipo di controllo è quello negativo, nel caso la correzione lavori nella direzione opposta del flusso dei dati, ottenendo una decelerazione o una totale inibizione di un processo; un esempio è la regolazione del livello di glucosio nel sangue. I controlli negativi all'interno del nostro corpo hanno il compito di ripristinare l'omeostasi, mentre quelli positivi di allontanare il nostro corpo da questa situazione di equilibrio, favorendo l'instabilità. I processi a controllo negativo sono molto più presenti rispetto a quelli a controllo positivo sia nel nostro organismo che nel mondo dell'automazione. [9]

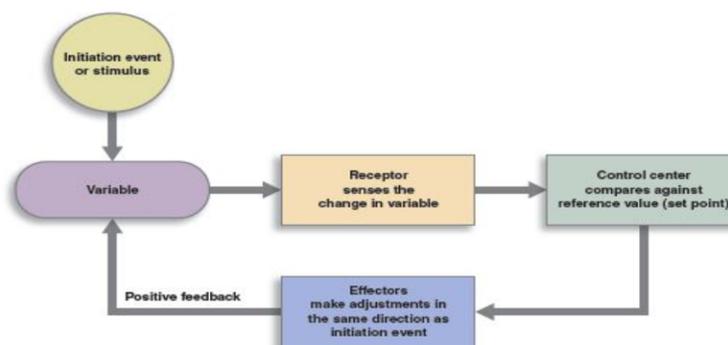


Figura 2.3: Sistema di controllo in retroazione positivo

Nelle Figure 2.3 e 2.4, possiamo notare come entrambi agiscono sullo stesso tipo di sistema (in questo caso a catena chiusa), cambiando solo lo stimolo

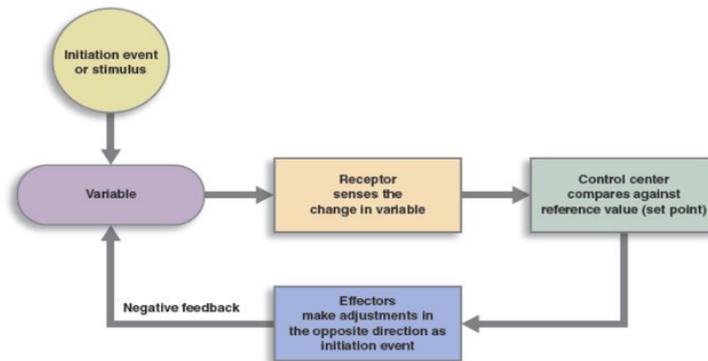


Figura 2.4: Sistema di controllo in retroazione negativa [10]

fornito.

In generale possiamo sempre definire un sistema di controllo attraverso uno schema a blocchi e, di conseguenza è sempre possibile trovare una relazione che permette di descrivere il sistema. Facendo riferimento alla Figura 2.5, ad esempio, otteniamo che:

$$E(s) = U(s) - H(s)Y(s) \quad (2.9)$$

dove i vari segnali sono espressi secondo la variabile complessa  $s$ , ovvero segnali nel dominio delle frequenze secondo la trasformata di Laplace. Da questa espressione si può ricavare la relazione ingresso-uscita, chiamata anche funzione di trasferimento, definita dal rapporto delle due funzioni uscita e ingresso:

$$G_{\text{retroazione}}(s) = \frac{Y(s)}{U(s)} \quad (2.10)$$

Nel caso del sistema a retroazione negativa possiamo definire la funzione di trasferimento sapendo che  $G(s) = Y(s)E(s)$ :

$$G_{\text{retroazione}}(s) = \frac{G(s)}{[1 + G(s)H(s)]} \quad (2.11)$$

ed è di fondamentale importanza nell'analisi e sintesi dei sistemi di controllo in quanto permette di definire l'andamento del sistema.

dove  $G(s)$  viene chiamata funzione di trasferimento della catena diretta,  $H(s)$  funzione di trasferimento del ramo in retroazione,  $G(s)H(s)$  funzione di trasferimento di guadagno di anello,  $U(s)$  la trasformata del segnale di riferimento,  $E(s)$  la trasformata del segnale errore e  $Y(s)$  la trasformata del segnale in uscita.

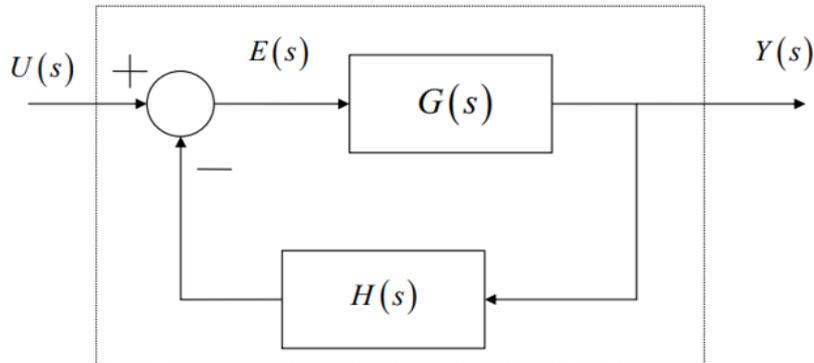


Figura 2.5: Generico schema a blocchi di un sistema a retroazione negativa

Uno dei componenti più importanti di un sistema di controllo automatico in retroazione è il controllore (o regolatore). Questo riceve in ingresso una misura della variabile controllata insieme al relativo segnale di riferimento; il suo compito è confrontarli: dovendo essere i due segnali il più possibile simili, il controllore lavorerà sempre sulla loro differenza (chiamata funzione errore). Esistono diverse tecniche per sintetizzare controllori in anello chiuso, ma il più usato nei sistemi di controllo automatico è il controllore PID (proporzionale-integrale-derivativo). Il PID regola l'uscita in base a tre parametri:

- Il valore del segnale di errore (azione proporzionale), descritto da una costante  $K_P$  moltiplicato per il segnale d'errore.
- I valori passati del segnale di errore (azione integrale), descritto da una costante  $K_I$  moltiplicato per l'integrale nel tempo del segnale d'errore.
- Quanto velocemente varia il segnale di errore (azione derivata), descritto da una costante  $K_D$  moltiplicato per la derivata del segnale rispetto al tempo.

Le tre azioni di un PID vengono calcolate separatamente e sommate algebricamente tra di loro per dare un'unica uscita. Il controllo PID ha il vantaggio di essere semplice, funzionale e implementabile in diverse tecnologie, ma ha come svantaggio le modeste prestazioni quando i sistemi non sono lineari.

Gli schemi a blocchi possono rappresentare un qualsiasi tipo di sistema di controllo in maniera semplice e immediata; la loro funzionalità si estende anche a sistemi biologici come, ad esempio, la regolazione del livello del glucosio nel sangue, mostrata in Figura 2.7

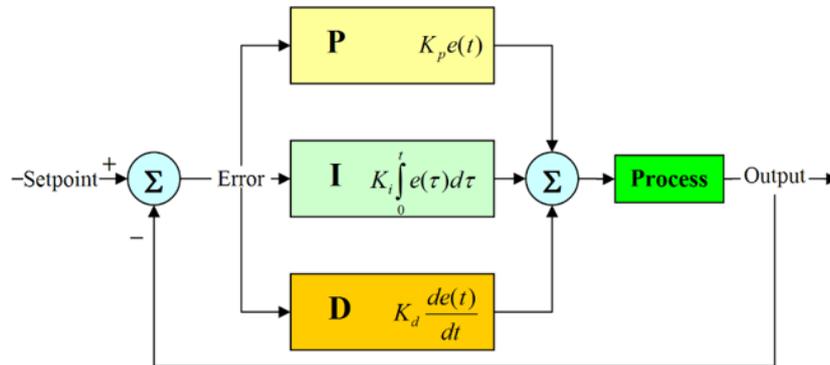


Figura 2.6: Controllore PID

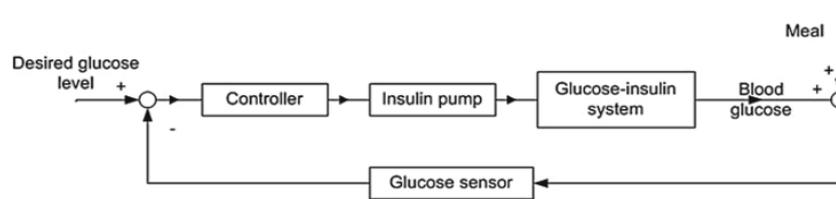


Figura 2.7: Schema a blocchi di un sistema di pompaggio di insulina.

In particolare, attraverso i sistemi di controllo siamo in grado anche di monitorare la crescita tumorale e studiare il comportamento delle cellule cancerose. Ad oggi possiamo ipotizzare lo schema a blocchi di un trattamento antitumorale attraverso un sistema a catena aperta, come mostrato in Figura 2.8

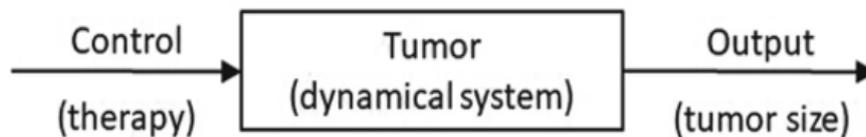


Figura 2.8: Controllo in catena aperta di un trattamento antitumorale.

A prescindere dal tipo di modello che viene usato per rappresentare il fenomeno, è possibile trovare delle caratteristiche comuni a tutti i sistemi di

controllo automatici che vogliono rappresentare il processo di crescita delle cellule cancerose:

- Trovare le condizioni necessarie (in termini di parametri del modello) per eradicare la popolazione tumorale.
- Valutare i diversi effetti, desiderati o indesiderati, che le terapie anti-tumorali possono avere sulle varie popolazioni cellulari.
- Sviluppare modelli matematici specifici basati sulla terapia somministrata, che rappresentino al meglio possibile la situazione rispetto a un determinato indice di prestazione.

La popolazione di cellule tumorali (intesa come insieme) può anche essere vista come un sistema robusto, ovvero capace di mantenere costanti determinate proprietà nonostante perturbazioni esterne. Nel nostro caso la proprietà che il sistema è in grado di preservare è quella di proliferare nonostante perturbazioni esterne come trattamenti antitumorali e cambiamenti biologici nell'organismo.

Nonostante le singole cellule siano considerate come sistemi fragili (quindi sistemi che alterano le loro proprietà facilmente a causa di una perturbazione), esse combinate sono in grado di rendere il sistema robusto attraverso le seguenti proprietà:

- Ridondanza funzionale: questo carattere è dovuto alla grande eterogeneità cellulare, che permette a una piccola porzione di popolazione cellulare tumorale (con alto potenziale metastatico) di riformare il tumore.
- Sistemi di controllo automatico intrinseco nella cellula tumorale: questi permettono ad alcune proprietà di rimanere invariate anche dopo diverse perturbazioni (come la chemioterapia). [11]

È proprio grazie al loro carattere di robustezza che le cellule cancerose sono così difficili da eradicare e necessitano di numerosi trattamenti, molto spesso con notevoli effetti collaterali. Nel prossimo paragrafo andremo a introdurre meglio dal punto di vista biologico le cellule tumorali e i vari trattamenti scoperti per combatterle.

## 2.3 Sistema immunitario e cellule tumorali

Prima di andare a introdurre quello che sarà effettivamente l'argomento portante della tesi, ovvero il controllo in retroazione del tumore, è necessario fare una piccola introduzione su come lavora il nostro sistema immunitario, le basi su cui fonda il trattamento immunoterapico e come le cellule cancerose si comportano all'interno del nostro organismo.

Una cellula viene definita cancerosa quando perde la sua abilità di regolare la sua crescita, causando una divisione cellulare incontrollata e numerosi problemi nella vita del paziente malato. La pericolosità di questo evento è data dalla distruzione dei tessuti circostanti e della possibilità di diffondersi nei tessuti limitrofi, andando a danneggiare qualche organo vitale.

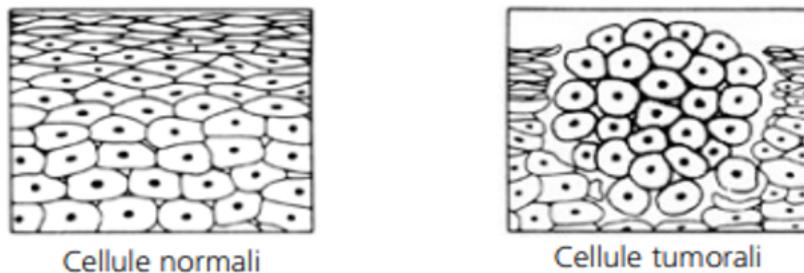


Figura 2.9: Rappresentazione di cellule tumorali e sane.

Per rappresentare al meglio la vita di una cellula è possibile sfruttare un modello compartimentale, ovvero un modello grafico (seguito da formule matematiche che lo descrivono) dove ogni compartimento rappresenta uno stadio della vita della cellula. Questi compartimenti sono poi messi in relazione tra di loro con frecce in entrata (ingressi) e in uscita (eliminazioni).

Il ciclo cellulare può essere rappresentato in vari modi e secondo diversi modelli, in questo caso viene preso come esempio un modello a quattro compartimenti, come mostrato in Figura 2.10:

- La fase  $G_1$  viene definita come l'intervallo di tempo che c'è tra mitosi e sintesi del DNA. In questa fase, grazie a stimoli extracellulari (come fattori di crescita), la cellula viene portata nella seconda fase del ciclo.
- La fase S è la fase di sintesi del DNA e di duplicazione del materiale genetico.

- La fase  $G_2$  è la fase subito successiva alla sintesi, ed è la fase in cui la cellula si prepara alla mitosi M, che porta alla divisione cellulare e alla creazione di due cellule uguali aventi lo stesso patrimonio.
- Le due cellule figlie possono quindi o tornare alla fase  $G_1$  e ricominciare il ciclo, oppure entrare in un'ulteriore fase  $G_0$  nella quale la cellula è dormiente.

Lo stesso ciclo cellulare presenta intrinsecamente un sistema di controllo automatico nelle fasi  $G_1$  e  $G_2$  nelle quali viene controllata l'integrità del filamento del DNA prima di proseguire con il ciclo stesso. [12]

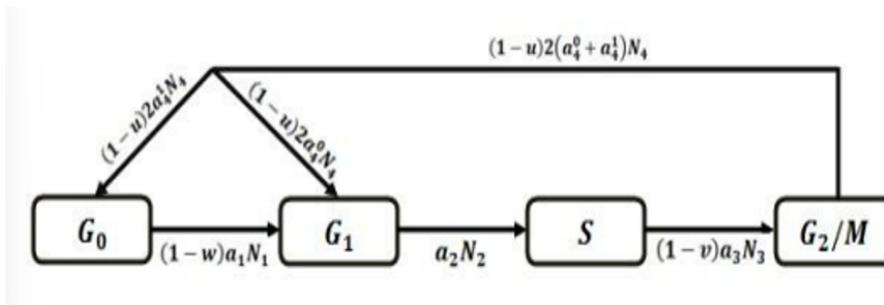


Figura 2.10: Modello compartimentale rappresentante il ciclo cellulare.

Il modello a compartimenti risulta molto efficace in quanto ci permette di visualizzare i segnali di controllo uscenti ed entranti da un determinato compartimento, nel caso volessimo perturbare il sistema.

Le perturbazioni che possiamo effettuare sul sistema delle cellule tumorali sono: chemioterapia, radioterapia o immunoterapia. Quest'ultima si basa sul concetto rivoluzionario di combattere i tumori come se fossero un'infezione, ovvero armando il sistema immunitario del paziente in maniera tale da riconoscere le cellule tumorali come agenti estranei e annientarle.

Il sistema immunitario lavora per riconoscere ed eliminare agenti esterni come batteri, parassiti, funghi, virus e cellule infettate da agenti patogeni. Esistono due tipi di difese che il nostro sistema immunitario attua per proteggere l'organismo:

- Immunità innata, chiamata anche immunità naturale, consiste in meccanismi pre-esistenti all'incontro con l'agente estraneo, in grado di agire con rapidità contro quest'ultimo, riconosciuto come una minaccia. È presente fin dalla nascita e comprende le barriere dell'organismo (come pelle, membrane, ...) e le cellule e le proteine circolanti che regolano

e mediano la risposta infiammatoria. Se l'agente esterno supera questa minaccia, l'organismo reagisce producendo sostanze per riparare i danni subiti.

- Immunità specifica, chiamata anche immunità acquisita, si sviluppa dopo la nascita e viene potenziata in risposta alle infezioni e agli agenti estranei che incontra. È specifica, quindi molto più veloce ed efficace rispetto a quella innata e può essere rafforzata con le vaccinazioni. Si tratta quindi di una difesa mirata nei confronti di determinati antigeni.

Il sistema immunitario quando capta una proliferazione incontrollata, reagisce scatenando un attacco da parte dei linfociti T col compito di eliminare la minaccia per l'organismo. Questo processo avviene anche nel caso dei tumori, e i due principali agenti killer in questo caso sono:

- CD4: è una proteina presente sui linfociti T che gli conferisce l'epiteto "helper"; la sua funzione fisiologica è per lo più incognita, ma in generale sappiamo che ha il compito di combattere le cellule cancerose.
- CD8: è anch'essa una proteina presente sui linfociti T e su una piccola popolazione di linfociti T helper; il compito principale delle cellule immunitarie con annessa questa proteina è quello dell'annientamento della cellula tumorale.

Il sistema immunitario presenta numerosi meccanismi di autoregolazione, basati su una serie di proteine che agiscono come acceleratori o freni sulle cellule T. Nel 2018 James P. Allison e Tasuku Honjo scoprirono la presenza di checkpoint immunologici, ovvero segnali che permettono di regolare la risposta immunitaria. [13]

Questi checkpoint impediscono ai linfociti T di effettuare il loro lavoro, e si attivano quando recettori presenti sui linfociti, come ad esempio CTLA-4, PD-1 e PD-2, interagiscono con i rispettivi ligandi. Molto spesso i tumori riescono a sfuggire al controllo del sistema immunitario in quanto, avendo i ligandi dei recettori PD-1 e PD-2 (chiamati PD-L1 e PD-L2), riescono ad inibire la funzionalità dei linfociti T e quindi avere una iper-attivazione dei checkpoint immunologici.

L'idea rivoluzionaria per la quale i due biologi guadagnarono il premio Nobel fu quella di usare anticorpi monoclonali per andare a bloccare il sito d'aggancio dei recettori PD-1 e PD-2 sui linfociti in modo da potenziare il sistema immunitario e permettere ai linfociti T di essere sempre vigili per poter eliminare il tumore.

Un'altra strategia, di ultimissima generazione, è denominata CAR-T e si basa

sull'ingegnerizzazione genetica dei linfociti T in maniera tale da potenziarli e combattere i tumori. A differenza della precedente tecnica, questa presenta una grandissima innovazione nella medicina personalizzata nel campo dei tumori, in quanto ogni dose viene sviluppata e prodotta per un singolo paziente partendo dalle sue stesse cellule immunitarie, alle quali viene attaccato un recettore CAR capace di aumentare la risposta immunitaria.

Nel corso degli anni, l'immunoterapia ha portato una vera rivoluzione nel trattamento di diverse forme tumorali, consentendo di evidenziare risposte come l'effettiva riduzione della massa tumorale e un incremento della sopravvivenza rispetto alle terapie tradizionali come chemioterapia, radioterapia e terapie target. Anche gli effetti collaterali sono ben diversi rispetto a quelli tipici delle altre terapie oncologiche, trattandosi per la maggior parte delle volte di reazioni infiammatorie causate dai farmaci che si dirigono verso il sito sbagliato.

Non agendo però direttamente sulle cellule tumorali, l'immunoterapia impiega tempi molto più lunghi prima di poter osservare effetti benefici sull'organismo: in alcuni casi, infatti possono trascorrere anche 16-20 settimane prima che si verifichi una risposta.

# Capitolo 3

## Modelli e metodi

Un modello matematico è una rappresentazione quantitativa con lo scopo di descrivere il più incisivamente possibile un determinato oggetto, un fenomeno reale naturale o un insieme di fenomeni. In generale possiamo rappresentare un qualsiasi problema risolvibile con un modello matematico seguendo lo schema in Figura 3.1

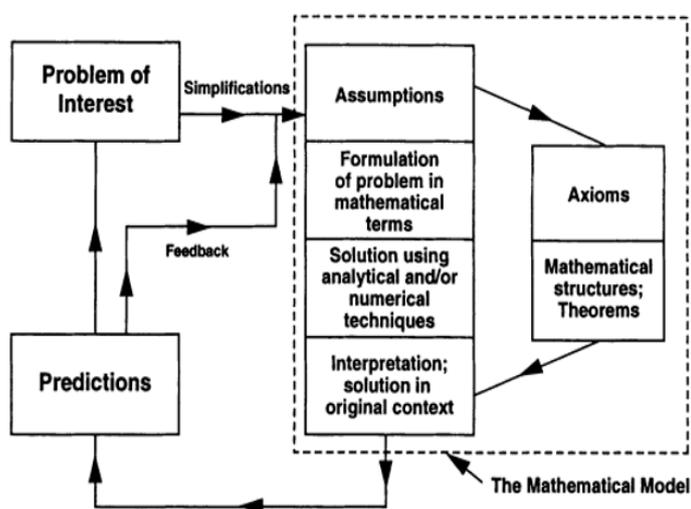


Figura 3.1: Rappresentazione concettuale di un modello matematico

Il modello matematico su cui la tesi si basa, è quello espresso nel 1994 da Kuznetsov e Taylor, che descrive la risposta delle cellule effettrici rispetto alla crescita delle cellule tumorali.

Prima di descrivere il modello, è doveroso introdurre la definizione generale

di cellule effettrici, ovvero cellule che causano una specifica azione in risposta a uno stimolo. Questo tipo di cellule si trovano principalmente nel sistema immunitario, e in questo ambito vengono definite come cellule dalla vita breve che vengono attivate per difendere l'organismo a causa di una risposta immunitaria. Nella tesi verranno prese in considerazione tre popolazioni di cellule effettrici:

- Linfociti T (T-cells), ovvero un particolare tipo di linfociti aventi l'abilità di riconoscere corpi estranei e dannosi per il nostro organismo.
- CIK (cytokine-induced killer cells), ovvero un sottogruppo dei linfociti T con particolari proprietà.
- NK (natural killer), ovvero globuli bianchi coinvolti nelle risposte immunitarie che hanno il compito di riconoscere e uccidere le cellule tumorali.

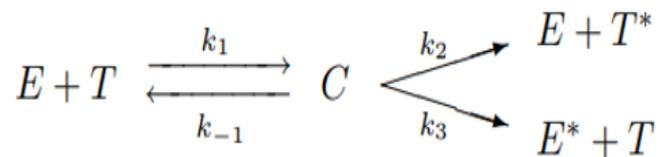


Figura 3.2: Interazioni fra cellule effettrici e cellule tumorali.

In Figura 3.2 possiamo vedere la rappresentazione grafica del modello di Kuznetsov, nel quale vengono indicate anche le costanti cinetiche e gli stati delle varie popolazioni cellulari nel tempo. Con  $C$  si intende il complesso di cellule tumorali ed effettrici insieme, che poi si differenziano in due possibili stati:  $E^*$  indica le cellule effettrici inattivate e  $T^*$  le cellule tumorali nello stadio finale della loro vita. [14]

Nella tesi viene proposto un particolare modello di Kuznetsov, ampliato considerando le seguenti variabili:

- Tre popolazioni di cellule effettrici attivate dal sistema immunitario,  $E(t)$ .
- La popolazione di cellule tumorali,  $T(t)$ ,

- La concentrazione di interleuchina-2,  $IL_2$ , nel compartimento dove è situato il tumore. Questa catena proteica viene prodotta dalle cellule e si può presentare in varie forme, questa in particolare è necessaria al differenziamento e all'espansione dei linfociti-T. Questa proteina viene trasmessa dal patrimonio genetico dei linfociti-T stessi.

Nella Figura 3.3 è fornita una rappresentazione grafica del sistema appena proposto tramite un modello a compartimenti, il quale mette in evidenza i rapporti tra le popolazioni cellulari. Si può subito notare come tutti e tre i compartimenti siano collegati tra di loro grazie alle cellule effettrici, le quali sintetizzano l'interleuchina 2 (la quale servirà poi ai linfociti T stessi per il loro differenziamento e potenziamento) ma interagiscono anche con le cellule tumorali, col fine di eradicarle; inoltre cellule effettrici e interleuchina 2 possono ricevere azioni esterne (input e morte cellulare) che descrivono l'aumento e il decremento della popolazione nel compartimento. Tutti le interazioni sono descritte meglio in seguito attraverso parametri specifici.

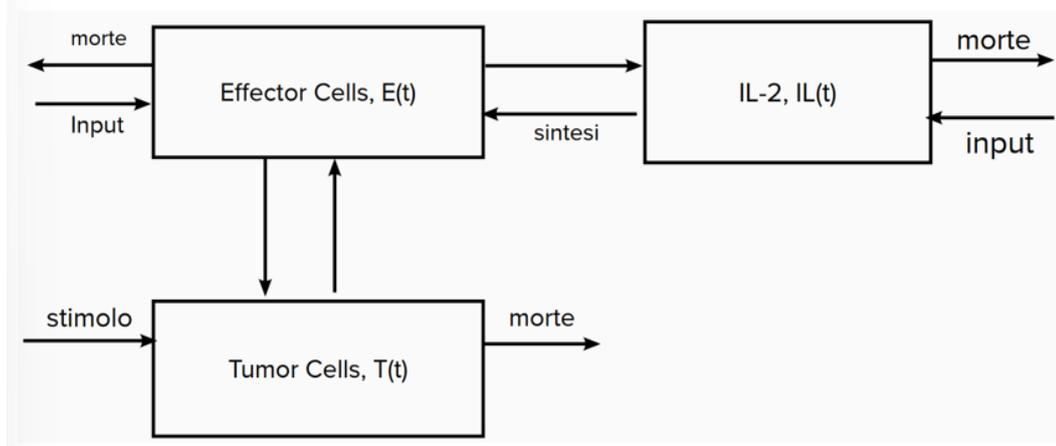


Figura 3.3: Modello compartimentale delle tre variabili prese in considerazione

Le interazioni tra le tre popolazioni sono governate da equazioni differenziali a ordine frazionario, che costituiscono la base del nostro modello:

$$D^{\alpha_1} E(t) = s_1 + p_1 E(t) T(t) - p_2 E(t) + p_3 E(t) I_L(t) \quad (3.1)$$

$$D^{\alpha_2} T(t) = p_4 T(t) (1 - p_5 T(t)) - p_6 E(t) T(t) \quad (3.2)$$

$$D^{\alpha_3} I_L(t) = s_2 + p_7 E(t) T(t) - p_8 I_L(t) \quad (3.3)$$

con  $0 \leq \alpha \leq 1, i = 1, 2, 3$  e dove  $s_1$  e  $s_2$  rappresentano rispettivamente il rateo entrante nel compartimento di cellule effettrici immunitarie e di inter-

leuchina 2. Bisogna prestare particolare attenzione al segnale  $s_1$ , in quanto non indica l'effettivo numero di cellule del sistema immunitario, ma solamente quello delle popolazioni effettrici in grado di poter combattere il tumore. Queste cellule possono entrare nel compartimento non per forza da un input esterno, ma anche a causa dell'attivazione biologica partendo dallo stato di cellule dormienti.

La prima equazione descrive la velocità con la quale cambia la popolazione delle cellule effettrici nel tempo, e viene descritta secondo i seguenti parametri:  $p_1$ , che rappresenta la risposta immunitaria alla comparsa del tumore,  $p_2$ , che rappresenta l'indice di morte delle cellule immunitarie e  $p_3$ , che rappresenta un indice di cooperazione tra cellule effettrici e interleuchina.

La seconda equazione descrive la velocità con la quale cambia la popolazione di cellule tumorali (le quali in assenza di risposta immunitaria tendono a continuare a crescere in numero fino ad arrivare a un valore per il quale si ha un plateau, chiamato capacità portante; questo tipo di crescita è chiamata anche logistica, mostrato nella Figura 3.4), e viene descritta secondo i seguenti parametri:  $p_4$ , che rappresenta un indice di crescita,  $p_5$ , che rappresenta l'inverso della capacità massima di cellule alla quale la popolazione tumorale tende nel tempo e  $p_6$  un indice delle cellule tumorali.

La terza equazione descrive la velocità con cui varia la concentrazione di interleuchina 2 nel tempo, e viene descritta secondo i seguenti parametri:  $p_7$ , che rappresenta un indice dipendente dalle cellule effettrici e quelle tumorali e  $p_8$ , che rappresenta un parametro di perdita di interleuchina 2.

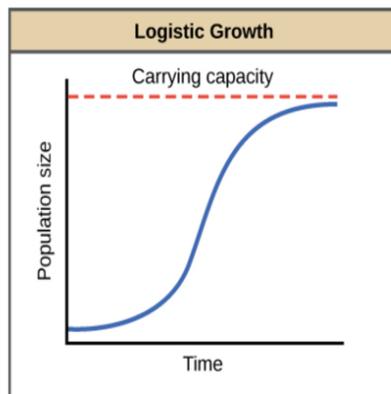


Figura 3.4: Comportamento del numero di cellule tumorali senza trattamento

Possiamo considerare i parametri tempo indipendenti, scalandoli nella seguente maniera:

$$\begin{aligned} x(t) &= \frac{E(t)}{E_0}, y(t) = \frac{T(t)}{T_0}, z(t) = \frac{I_L(t)}{I_{L_0}} \\ \sigma &= \frac{s_1}{E_0 t_0}, \omega = \frac{p_1 t_0}{t_0}, \delta = \frac{p_2}{t_0}, \theta = \frac{p_3 I_{L_0}}{t_0}, \gamma = \frac{p_4}{t_0}, \beta = p_5 T_0, \\ \sigma' &= \frac{s_2}{I_{L_0} t_0}, \omega' = \frac{p_7 E_0 T_0}{I_{L_0} t_0}, \delta' = \frac{p_8}{t_0} \end{aligned}$$

Dove  $E_0, T_0, I_{L_0}$  rappresentano rispettivamente il numero di cellule effettrici, di cellule tumorali e il valore di Interleuchina-2 nel compartimento all'istante  $t_0$ .

Applicando queste sostituzioni alle equazioni differenziali 3.1, 3.2, 3.3 otteniamo:

$$D^\alpha x(t) = \sigma + \omega x(t)y(t) + \delta x(t) + \theta x(t)z(t) \quad (3.4)$$

$$D^\alpha y(t) = \gamma y(t)(1 - \beta y(t)) - x(t)y(t) \quad (3.5)$$

$$D^\alpha z(t) = \sigma' + \omega' x(t)y(t) - \delta' z(t) \quad (3.6)$$

dove  $x(0) = x_0 \geq 0, y(0) = y_0 \geq 0, z(0) = z_0 \geq 0$  sono le condizioni iniziali nei tre compartimenti e  $\alpha$  rappresenta l'ordine della derivata frazionaria.

Confrontando i coefficienti nelle equazioni 3.1, 3.2, 3.3 e quelli nelle 3.4, 3.5, 3.6, possiamo attribuire a ognuno di essi un significato all'interno del processo biologico:  $\sigma$  rappresenta il rateo di cellule effettrici entrante nel compartimento,  $\delta$  rappresenta un indice di morte delle cellule effettrici,  $\omega$  rappresenta la risposta del sistema immunitario al tumore,  $\theta$  è un indice di cooperazione fra cellule effettrici e interleuchina 2,  $\gamma$  è il rateo di crescita delle cellule tumorali, l'inverso di  $\beta$  rappresenta la capacità portante delle cellule tumorali in un determinato ambiente biologico,  $\sigma'$  rappresenta il rateo di cellule interleuchina 2,  $\omega'$  rappresenta il rateo di competizione tra cellule tumorali ed effettrici e  $\delta'$  rappresenta la perdita di cellule interleuchina 2.

Con le precedenti equazioni viene descritto, attraverso derivate frazionarie, in che modo i tre compartimenti interagiscono fra di loro; è ora necessario eseguire un'analisi di stabilità di questo sistema per capire per quali valori dei parametri precedentemente descritti il sistema assume un carattere stabile.

Parameters	Biological meanings	Parameter values
$\sigma$	External source of effector cells	(0, 1)
$\omega$	Antigenicity rate of tumor (immune response to the tumor)	0.04
$\delta$	Death rate of effector cells	0.3743
$\theta$	Cooperation rate of effector cells to interleukin-2 parameter	1
$\gamma$	Growth rate of tumor cells	1.636
$\beta^{-1}$	Maximal carrying capacity of the Biological Environment	$2 \times 10^{-3}$
$\sigma'$	External source of input for Interleukin-2 cells	1
$\omega'$	Competition rate between tumor cells and effector cells	1
$\delta'$	loss rate parameter of interleukin-2	0.02

Figura 3.5: Riassunto dei parametri sopracitati con annessi valori in un caso specifico

Risolvendo il seguente sistema di equazioni è possibile ottenere i punti di stabilità  $E_0, E_1, E_2, E_3$ :

$$\sigma + \omega x(t)y(t) + \delta x(t) + \theta x(t)z(t) = 0 \quad (3.7)$$

$$\gamma y(t)(1 - \beta y(t)) - x(t)y(t) = 0 \quad (3.8)$$

$$\sigma' + \omega' x(t)y(t) - \delta' z(t) = 0 \quad (3.9)$$

Le tre equazioni vengono poste uguali a zero perché rappresentano la velocità di crescita delle varie popolazioni cellulari; quindi, se annullate è possibile ottenere le condizioni per le quali la crescita della popolazione viene bloccata. I punti di equilibrio dati dalla risoluzione di questo sistema sono  $E_0(\frac{\sigma}{\gamma}, 0, 0)$ , ovvero il punto di equilibrio per il quale non sono più presenti cellule tumorali, ed  $E_1(\frac{\sigma\omega' - \sigma'\omega}{\delta\omega'}, \frac{1+\Delta}{2\beta}, 0)$ , dove  $\Delta = \frac{1+4\beta\sigma'}{\gamma\omega'}$ ,  $E_2(0, \frac{1}{\beta}, \frac{\sigma'}{\delta})$ ,  $E_3(\bar{x}, \bar{y}, \bar{z})$ , ovvero i punti di equilibrio di coesistenza.

In particolare, ci andremo a concentrare sul valore di  $E_0$ . Partendo da questo valore è possibile ricavare la condizione da soddisfare per avere stabilità.

La suddetta condizione può essere ottenuta attraverso l'uso di conoscenze algebriche sulla matrice Jacobiana. Il punto di equilibrio (nel nostro caso  $E_0$ ) rende il sistema asintoticamente stabile:

- se e solo se tutti gli autovalori  $\lambda_i$ , con  $i = 1, 2, \dots, n$ , della matrice  $J(E_0)$  soddisfano la condizione  $|\arg(\lambda_i)| > \frac{\alpha\pi}{2}$ .
- se tutti gli autovalori  $\lambda_i$ , con  $i = 1, 2, \dots, n$ , della matrice  $J(E_0)$  soddisfano la condizione  $|\arg(\lambda_i)| \geq \frac{\alpha\pi}{2}$ , e gli autovalori che soddisfano

la condizione  $|\arg(\lambda_i)| = \frac{\alpha\pi}{2}$  hanno la stessa molteplicità algebrica e geometrica.

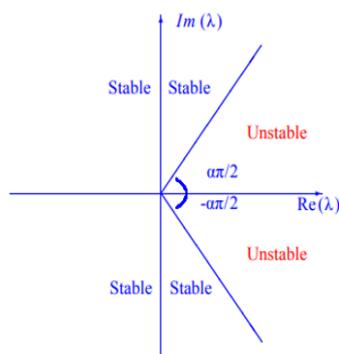


Figura 3.6: Analisi grafica della condizione di stabilità

In Figura 3.6 possiamo notare come se  $\alpha > 1$  la regione di instabilità aumenta, di conseguenza è possibile subito porre la condizione per la quale  $0 \leq \alpha \leq 1$ . [15]

La matrice Jacobiana del modello calcolata nel punto di equilibrio  $E_0$  risulta la seguente:

$$J(E_0) = \begin{pmatrix} -\delta & \frac{\sigma\omega}{\delta} & \frac{\sigma\theta}{\delta} \\ 0 & \gamma - \frac{\sigma}{\delta} & 0 \\ 0 & \frac{\sigma\omega'}{\sigma} & -\delta' \end{pmatrix}$$

Gli autovalori risultano  $\lambda_1 = -\delta$ ,  $\lambda_2 = \gamma - \frac{\sigma}{\delta}$ ,  $\lambda_3 = -\delta'$ , dove  $\lambda_1$  e  $\lambda_3$  soddisfano sempre la condizione  $|\arg(\lambda)| > \frac{\alpha\pi}{2}$ . Per far sì che  $\lambda_2$  soddisfi la medesima condizione, bisogna invece porre  $\sigma > \delta\gamma$ .

È possibile trovare le condizioni di stabilità anche per le altre popolazioni cellulari a partire dai punti di equilibrio sopra descritti e la loro matrice Jacobiana.

La stabilità asintotica di una popolazione di cellule tumorali è quindi verificata se e solo se  $\sigma > \gamma\delta$ . Il sistema è quindi dipendente dai seguenti parametri:

- $\alpha$ , ovvero l'ordine della derivata frazionaria.
- $\sigma$ , ovvero il rateo di cellule effettrici immesse nel compartimento.

Attraverso un'analisi matematica e sfruttando la Neimark-Sacker bifurcation è possibile risalire a dei valori di  $\alpha$  e  $\sigma$  per i quali la funzione ha comportamento notevole:

- Per  $\sigma = \bar{\sigma} < 0.075445$ , la funzione che rappresenta la popolazione delle cellule tumorali mostra un comportamento oscillatorio con grande ampiezza nei picchi; di conseguenza il sistema è fortemente instabile.
- Per  $\sigma \approx 0.612 (= \gamma\delta)$  le cellule effettrici riescono completamente a eradicare il tumore, annientando tutta la popolazione di cellule tumorali.
- Per  $\alpha \approx 0.794117$  abbiamo il miglior fitting possibile della funzione al caso reale.

Dati questi valori è possibile andare ad analizzare come varia il sistema per valori intermedi di  $\alpha$  e per altri valori di  $\sigma$ :

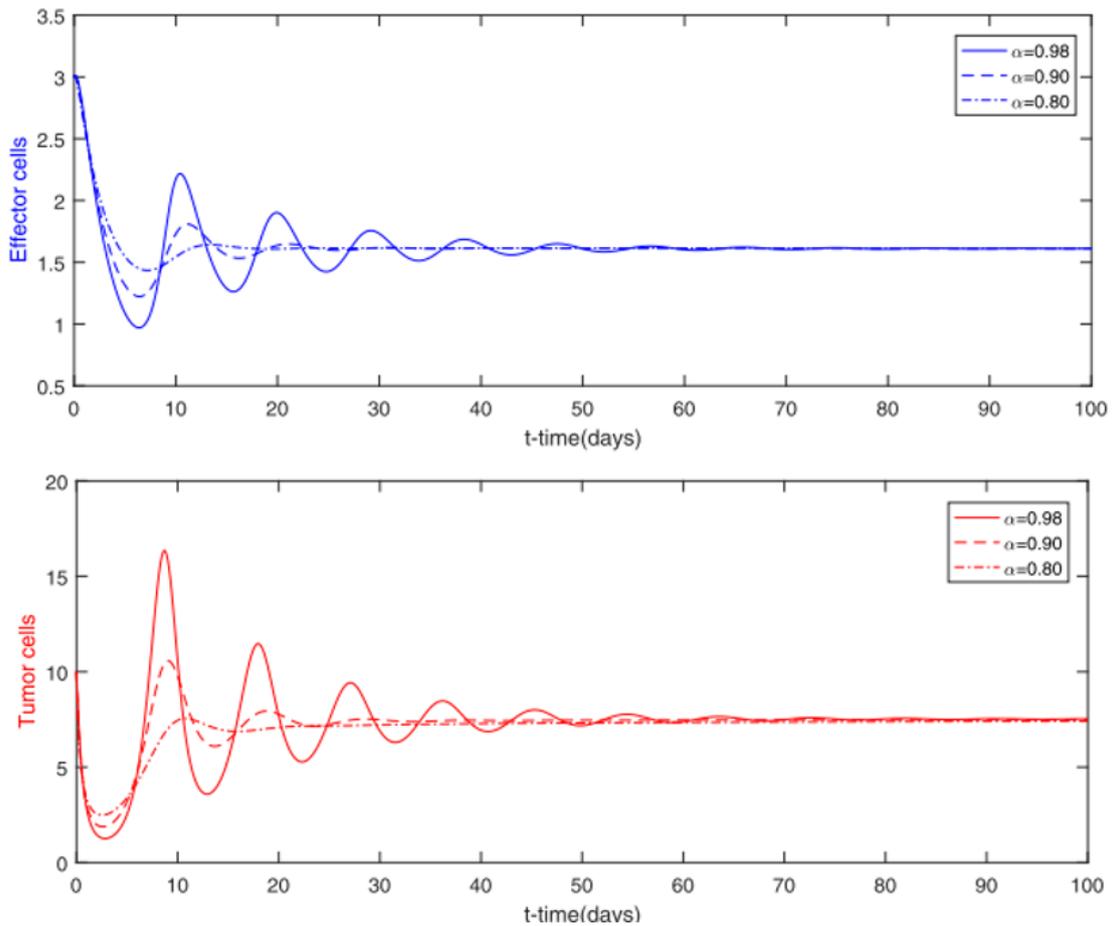


Figura 3.7: Andamento delle cellule effettrici e delle cellule tumorali per  $\sigma = 0.1181$ .

Come ipotizzato precedentemente attraverso calcoli teorici, è possibile verificare che per  $\sigma$  tendente al valore limite  $\bar{\sigma}$  entrambe le funzioni assumono carattere oscillatorio smorzato, in grado di raggiungere il valore a regime in un tempo molto elevato, inoltre, proprio dal valore a regime è possibile notare come la popolazione di cellule tumorali non sia stata intaccata dalla terapia. Questo fatto indica che il valore di  $\sigma = 0.1181$  non rappresenta un numero di cellule effettrici immesse nel compartimento sufficiente a eradicare il tumore, ma è necessario effettuare ulteriori analisi per  $\sigma$  maggiori. Possiamo anche notare come variando  $\alpha$  per valori  $< 1$ , il sistema passi attraverso stati intermedi sempre più stabili al calare di  $\alpha$ , fino al suo valore limite 0.794117. Per valori di  $\alpha$  minori di quello che è considerato il suo valore limite, il sistema tende a uno stato caotico e disordinato, quindi meno stabile. [16]

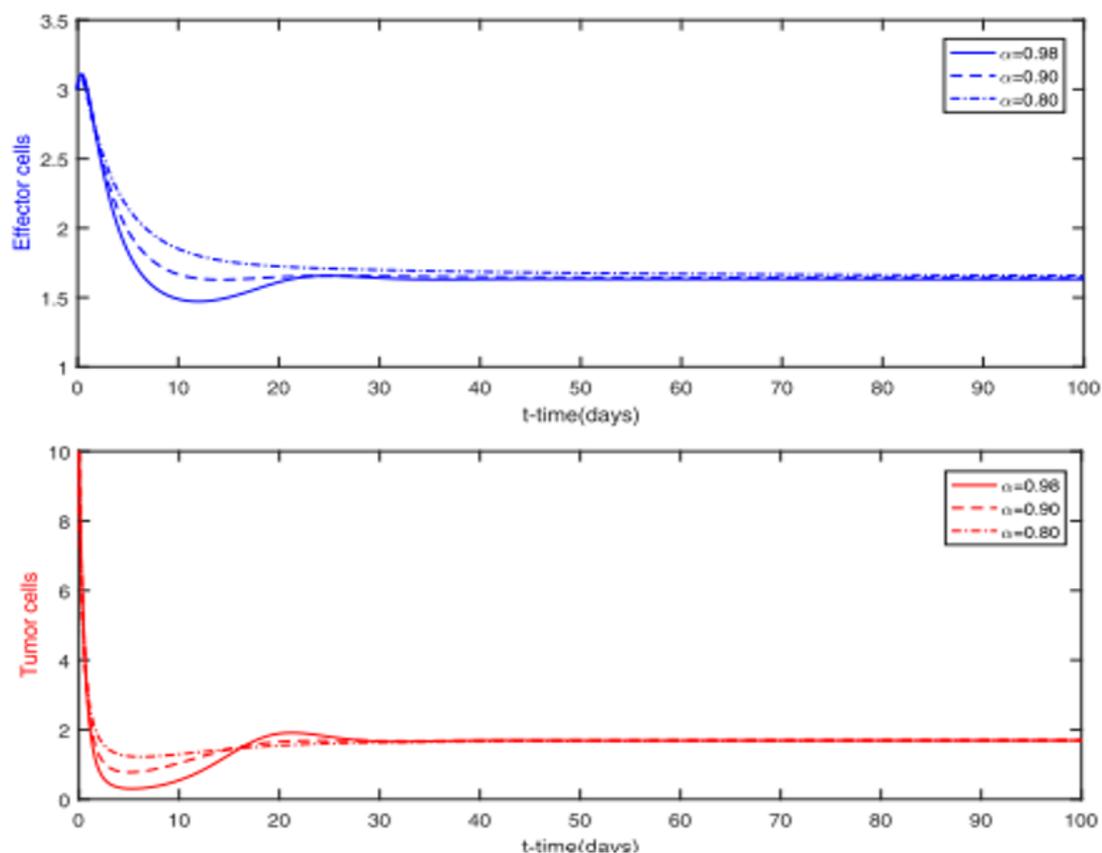


Figura 3.8: Andamento delle cellule effettrici e delle cellule tumorali per  $\sigma = 0.5$ .

Analizzando i grafici in Figura 3.8 è possibile confermare, come nei precedenti grafici, che al calare di  $\alpha$  fino al suo valore limite, la funzione tende a stadi sempre più stabili. Confrontando ora i grafici in Figura 3.7 e quelli in Figura 3.8 possiamo individuare le differenze fra la simulazione con  $\sigma = 0.1181$  e quella con  $\sigma = 0.5$ . Come affermato, per valori di  $\sigma$  maggiori del valore limite  $\bar{\sigma}$ , entrambe le funzioni hanno un comportamento molto più stabile, diminuendo in maniera significativa il carattere oscillatorio, ma non eliminandolo del tutto. Per  $\sigma = 0.612$ , ovvero il valore per il quale  $\sigma = \gamma\delta$ , è possibile osservare un comportamento ideale del sistema, privo di componente oscillatoria e con il minor tempo impiegato per raggiungere il valore a regime e con lo stesso valore a regime nullo. All'aumentare di  $\sigma$  viene quindi analizzata una scomparsa progressiva del carattere oscillatorio e una diminuzione del valore a regime per quanto riguarda le cellule tumorali.

Una volta studiati i parametri che permettono di rendere stabile l'andamento delle cellule tumorali, è possibile progettare un sistema di controllo automatico che provveda a mantenere questi parametri sopra al loro valore di soglia. La principale variabile di controllo in questo sistema è  $\sigma$ , in quanto  $\alpha$  è un parametro puramente teorico con il quale viene analizzato il sistema.

Nella terapia i farmaci immunologici hanno un ruolo fondamentale in quanto hanno il compito di inibire i checkpoint immunitari e quindi permettere un maggiore afflusso di cellule effettrici. Questi farmaci possono essere diversi in base al tipo di tumore al quale vengono applicati:

- Ipilimumab: utilizzato per il melanoma.
- Nivolumab: utilizzato per il melanoma, carcinoma polmonare non a piccole cellule, carcinoma a cellule renali, . . .
- Pembrolizumab: utilizzato per il melanoma, carcinoma polmonare non a piccole cellule, carcinoma uroteliale e linfoma di Hodgkin classico.
- Atezolizumab: utilizzato per trattamento del carcinoma uroteliale e carcinoma polmonare non a piccole cellule.
- Avelumab: utilizzato per il carcinoma a cellule di Merkel.

Le variabili del sistema di controllo che verrà progettato sono:

- $y(t)$ , ovvero la popolazione di cellule tumorali. Nel nostro caso questo valore indica l'output del sistema.

- $x(t)$ , ovvero la popolazione di cellule effettrici, vere responsabili della distruzione del tumore. Questa variabile rappresenta la nostra variabile di controllo, che vogliamo mantenere sopra una certa soglia per garantire la corretta riuscita della terapia.
- $\sigma$ , ovvero l'input di cellule effettrici che entrano nel compartimento; queste saranno proporzionali alla quantità di farmaco immunoterapico somministrato in quanto occupando i siti di legame PD-L1 e PD-L2 del tumore, permettono alle cellule effettrici (linfociti T, CIK e NK) di restare permanentemente attive, e quindi entrare nel compartimento come cellule attive in grado di combattere il tumore.

Il modello analizzato è alle derivate frazionarie (FDM fractional differential model), il quale consente una maggiore flessibilità con un minor numero di parametri concentrati da calibrare, il che si traduce in una semplificazione notevole. La flessibilità di tale modello è data dal fatto che l'ordine di derivazione può variare al fine di ottenere una legge costitutiva adatta al fenomeno in questione.

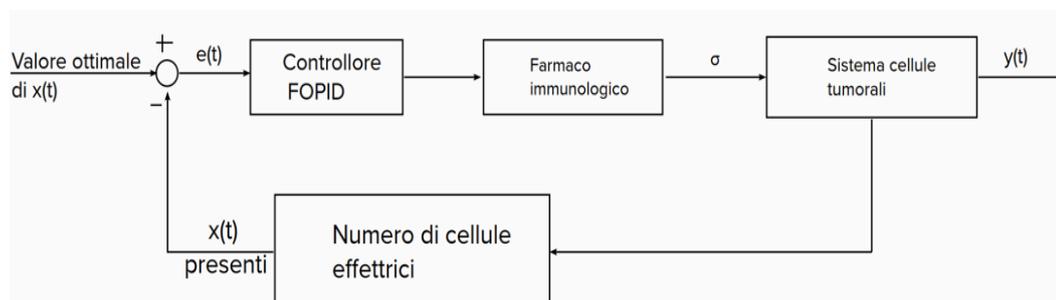


Figura 3.9: Rappresentazione grafica del modello di controllo automatico proposto nella tesi.

Come è possibile vedere in Figura 3.9, per garantire la completa eradicazione della popolazione tumorale, è necessario un controllo in retroazione di  $x(t)$ , ovvero la popolazione di cellule effettrici. La vera condizione che abbiamo ottenuto dall'analisi di stabilità del sistema è che  $\sigma$  deve essere maggiore di  $\gamma\delta$ , ma  $\sigma$  si ripercuote direttamente sul sistema di cellule effettrici, in quanto ne incrementa il numero. Per effettuare il controllo è quindi necessario risalire al numero di cellule effettrici presenti nell'organismo nel sito del tumore attraverso un sensore che ne rileva la presenza. Una volta ottenuto il valore di  $x(t)$  presente nel sistema è necessario confrontarlo con un valore ottimale, ovvero quello necessario per eradicare il tumore. È possibile trovare questo

valore, puramente teorico, dall'analisi di stabilità del sistema, date le condizioni iniziali delle popolazioni prese in considerazione.

All'entrata del controllore avremo quindi la differenza che c'è tra numero di cellule desiderate e quelle effettivamente presenti nel sistema. In base a questo valore, ovvero l'errore, è possibile ricavare un segnale proporzionale a quest'ultimo che indichi la quantità di farmaco immunologico (e quindi di anticorpi monoclonali) da iniettare nell'organismo. Questi farmaci permettono il risveglio di alcune cellule effettrici dormienti, favorendone il differenziamento nelle varie popolazioni precedentemente elencate, ma soprattutto inibendo i checkpoint immunologici e frenando l'immunosorveglianza. Il valore di cellule effettrici che vengono attivate e che quindi entrano nel sistema, è considerato come  $\sigma$ . Le cellule effettrici appena introdotte nel sistema a questo punto interagiranno con il sistema delle cellule tumorali, combattendolo. In base all'interazione tra i due sistemi, verrà effettuato un controllo automatico in retroazione avvalendoci del sensore precedentemente accennato.

Avendo a che fare con diverse popolazioni di cellule effettrici, risulterà complicato costruire un sensore che riesca a captare la presenza di tutte le cellule effettrici presenti nell'organismo. È però possibile realizzare un sensore che possa rilevare le singole popolazioni di cellule effettrici, elencate a inizio capitolo. I sensori che, ad oggi, sono stati ideati e realizzati sono quello per i linfociti T e quello per le natural killer cells [17][18]. Per quanto riguarda le cellule CIK, non è stato ancora proposto un metodo di rilevamento all'interno dell'organismo.

Nel modello proposto viene utilizzato un controllore PID di ordine frazionario (FOPID), il quale garantisce maggiore flessibilità all'apparato di controllo in sé in quanto, a differenza della sua controparte a ordine intero, permette di selezionare cinque parametri invece che solo tre. Il tipo di FOPID più comune è il  $PI^\lambda D^\mu$ , che fornisce migliore controllo dei sistemi dinamici e permette una descrizione più accurata dei modelli matematici a ordine frazionario grazie ai parametri reali  $\lambda$  e  $\mu$ ; un altro vantaggio sta nella maggior sensibilità ai cambiamenti dei parametri nel sistema controllato. In generale, nonostante la maggiore flessibilità fornita dai due parametri  $\lambda$  e  $\mu$ , essi causano ovviamente una maggiore complessità nella calibrazione del dispositivo. Possiamo analizzare la funzione di uscita dei controllori  $PI^\lambda D^\mu$  :

$$u(t) = k_p + k_D D^{-\lambda} e(t) + k_I D^\mu e(t) \quad (3.10)$$

La calibrazione del controllore è fondamentale per la simulazione del modello in quanto ci permette di fissare i parametri del sistema. È importante sottolineare determinate casistiche per valori di  $\lambda$  e  $\mu$  notevoli:

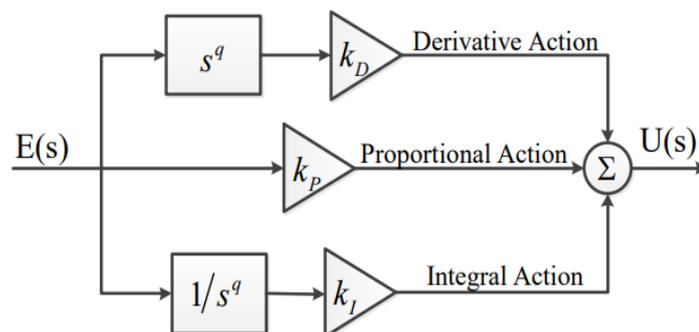


Figura 3.10: Schema a blocchi di un FOPID. [19]

- Per  $\lambda = 1$  e  $\mu = 1$ , il controllore FOPID si comporta come un normale controllore PID.
- Per  $\lambda = 0$  e  $\mu = 1$ , il controllore FOPID si comporta come un controllore PD.
- Per  $\lambda = 1$  e  $\mu = 0$ , il controllore FOPID si comporta come un controllore PI.
- Per  $\lambda = 0$  e  $\mu = 0$  il controllore FOPID si comporta come un semplice controllore proporzionale, eliminando quindi la componente integrativa e derivativa.

Esistono inoltre differenti metodi per effettuare la calibrazione del controllore, come il metodo di ottimizzazione minima di Ziegler-Nicholas.

# Conclusioni

In questa tesi è stato preso in considerazione un trattamento immunoterapico e sono state ricavate le condizioni di stabilità del sistema delle cellule tumorali attraverso un modello a derivate frazionarie. Sulle basi dei valori ottenuti è stato proposto un sistema di controllo automatico in retroazione, col compito di automatizzare il processo immunoterapico attraverso un controllore PID di ordine frazionario.

È importante sottolineare come le derivate frazionarie e tutto il calcolo frazionario siano una branca della matematica che nasconde ancora diverse incognite. Nonostante alcune proprietà siano già note agli occhi degli studiosi, sono ancora forte argomento di studio per numerosi matematici. Se riuscissimo a comprendere pienamente le proprietà di questo operatore, riusciremmo a rappresentare in maniera molto più affidabile alcuni modelli, sia biologici che inerenti al mondo dell'automazione. Anche il controllore FOPID è tuttora in fase di studio per migliorare i processi di calibrazione e progettazione in sé. Durante la fase di approccio al caso reale è importante tenere conto della valutazione dei parametri del sistema, in quanto questi possono essere estremamente variabili in base sia al tipo di tumore trattato e sia alla zona in cui esso si presenta. Questa eterogeneità implica un'importante analisi e uno studio del sistema biologico specifico del paziente per evitare di eseguire trattamenti eccessivamente dannosi per le cellule sane, oppure non sufficientemente efficaci per eradicare il tumore.

Un'altra valutazione importante riguarda il tipo di derivata frazionaria che viene usata per descrivere il modello; infatti, ogni tipologia presente in letteratura mostra proprietà differenti ed è in grado di rappresentare meglio un determinato evento rispetto alle altre. Ogni tipo di derivata frazionaria (Caputo, Riemann-Liouville, conformable, ...) è in grado di descrivere un preciso fenomeno ma alcuni risultati potrebbero essere diversi fra di loro se studiati attraverso diverse formule; nessun risultato è sbagliato ma sono tutti corretti e coerenti con le ipotesi fatte nella definizione dell'operatore in sé.

Secondo le derivate di Caputo, con le quali viene analizzato il sistema, la migliore approssimazione al caso reale di crescita tumorale viene fornito dal

valore di  $\alpha$  pari a 0,794117. Questa informazione ci mostra come l'analisi attraverso derivate frazionarie sia necessaria per studiare l'andamento delle cellule tumorali nel tempo.

Il modello analizzato in tesi è un modello puramente teorico proposto da me sulla base delle informazioni ottenute dall'analisi di stabilità del sistema cellule tumorali nel modello di Kuznetsov esteso. Non sono state effettuate simulazioni del modello in quanto non è stata proposta una calibrazione del controllore FOPID, è possibile però avere un riscontro simulato nel caso della chemioterapia, come mostrato in Figura 1.1, dove viene proposto un modello di controllo automatico molto simile a quello proposto in tesi. Nello studio citato, possiamo notare come la cura sia estremamente efficace nelle varie fasi del ciclo cellulare. [4]

In generale, una volta trovato il valore del parametro  $\alpha$  ideale, il modello a derivate frazionarie presentato, potrebbe essere implementato calibrando opportunamente il controllore e simulando il comportamento del sistema sul software SIMULINK.

Questo approccio di automatizzazione dell'immunoterapia è un progetto ancora lontano dalla sperimentazione negli ospedali in quanto è richiesto molto tempo per la calibrazione del controllore FOPID, oltre che un discreto costo per la realizzazione. È inoltre necessario effettuare prima delle simulazioni, e successivamente esami sperimentali per verificare la veridicità del modello proposto.

Nel caso il sistema di controllo funzioni e mostri i risultati ipotizzati, potrebbe però essere una nuova frontiera per la lotta contro il cancro, riuscendo ad automatizzare un processo che ad ora ha richiesto intervento manuale.

# Elenco delle figure

1.1	Grafico del numero di cellule tumorali nel tempo in caso di chemioterapia . . . . .	5
2.1	Andamento delle funzioni $x^n$ per $n = 1, 2, 3$ . . . . .	7
2.2	Derivate frazionarie con ordine crescente . . . . .	9
2.3	Sistema di controllo in retroazione positivo . . . . .	10
2.4	Sistema di controllo in retroazione negativo [10] . . . . .	11
2.5	Generico schema a blocchi di un sistema a retroazione negativa	12
2.6	Controllore PID . . . . .	13
2.7	Schema a blocchi di un sistema di pompaggio di insulina. . . .	13
2.8	Controllo in catena aperta di un trattamento antitumorale. . .	13
2.9	Rappresentazione di cellule tumorali e sane. . . . .	15
2.10	Modello compartimentale rappresentante il ciclo cellulare. . . .	16
3.1	Rappresentazione concettuale di un modello matematico . . . .	19
3.2	Interazioni fra cellule effettrici e cellule tumorali. . . . .	20
3.3	Modello compartimentale delle tre variabili prese in considerazione . . . . .	21
3.4	Comportamento del numero di cellule tumorali senza trattamento . . . . .	22
3.5	Riassunto dei parametri sopracitati con annessi valori in un caso specifico . . . . .	24
3.6	Analisi grafica della condizione di stabilità . . . . .	25
3.7	Andamento delle cellule effettrici e delle cellule tumorali per $\sigma = 0.1181$ . . . . .	26
3.8	Andamento delle cellule effettrici e delle cellule tumorali per $\sigma = 0.5$ . . . . .	27
3.9	Rappresentazione grafica del modello di controllo automatico proposto nella tesi. . . . .	29
3.10	Schema a blocchi di un FOPID. [19] . . . . .	31

# Bibliografia

- [1] Montagnini, L. “La Cibernetica alle origini delle Scienze dell’Informazione”.262.
- [2] Vasilyev, G. F. “Cybernetics and biology ”. *Biophysics* 58, 573–576 (2013).
- [3] Hanahan, D. & Weinberg, R. A. “The Hallmarks of Cancer ”. *Cell* 100, 57–70 (2000).
- [4] Balatif, O., Rachik, M. & Rachik, Z. “Optimal control for multi-input bilinear systems with an application in cancer chemotherapy ”. Volume 3, 22–31 (2015)
- [5] “Maximizing Automation for Chemotherapy Management: September 2021 - Pharmacy Purchasing & Products Magazine ”. <https://www.pppmag.com/article/2803>.
- [6] Kimeu, J. M. “Fractional Calculus: Definitions and Applications ”. 61.
- [7] de Oliveira, E. C. & Tenreiro Machado, J. A. “A Review of Definitions for Fractional Derivatives and Integral ”. *Math. Probl. Eng.* 2014, 1–6 (2014).
- [8] Abdul-Atty, Mohammad Mabrouk, Mohamed “What Lies Between a Function and Its Derivative? ”(SoME2) | *Fractional Calculus*. (2022).
- [9] Vix. “Feedback mechanism - Definition and Examples - Biology Online Dictionary. Biology Articles, Tutorials ”& Dictionary Online <https://www.biologyonline.com/dictionary/feedback-mechanism> (2021).
- [10] “Course Hero ”. <https://www.coursehero.com/study-guides/cuny-csi-ap-1/feedback-loops/>.

- [11] Kitano, H. “Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy.” *Nat. Rev. Cancer* 4, 227–235 (2004).
- [12] Israels, E. D. & Israels, L. G. “The Cell Cycle. *The Oncologist*”5, 510–513 (2000).
- [13] “CAR-T e Immunoterapia. Osservatorio Terapie Avanzate” <https://www.osservatorioterapieavanzate.it/terapie-avanzate/immunoterapia>.
- [14] Gałach, M. “DYNAMICS OF THE TUMOR—IMMUNE SYSTEM COMPETITION—THE EFFECT OF TIME DELAY ”. 12.
- [15] “Dynamics of Tumor-Immune System with Fractional-Order ”. <https://www.longdom.org/open-access/dynamics-of-tumorimmune-system-with-fractionalorder-jtr-1000109.pdf>.
- [16] “Dynamical behaviour of fractional order tumor model with Caputo and conformable fractional derivative ”| Elsevier Enhanced Reader. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0960077919300931?token=C226C6CB529B073FE360DCF3EF834AA793139FA82A234041E7C78F9C90A32DEF3A3315DABCD4ED19248757C9EC04D496&originRegion=euro-west-1&originCreation=20221017090622> doi:10.1016/j.chaos.2019.03.032.
- [17] Kim, H., Cohen, R. E., Hammond, P. T. & Irvine, D. J. “Live Lymphocyte Arrays for Biosensing ”. *Adv. Funct. Mater.* 16, 1313–1323 (2006).
- [18] Federici, C. et al. “Natural-Killer-Derived Extracellular Vesicles: Immune Sensors and Interactors ”. *Front. Immunol.* 11, 262 (2020).
- [19] Reza, M. & Nemati, A. “On Fractional-Order PID Design. in *Applications of MATLAB in Science and Engineering* ”(ed. Michalowski, T.) (InTech, 2011). doi:10.5772/22657.