



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

**MODELLIZZAZIONE DELLA FARMACOCINETICA DI
DOXORUBICINA IN CELLULE DI MIELOMA MULTIPLO
TRAMITE APPROCCIO DI POPOLAZIONE**

Relatore: Prof. Roberto Visentin

Laureanda: Anna Violato

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 21/03/2023

ABSTRACT

Il mieloma multiplo (MM) è una neoplasia ematologica caratterizzata dalla proliferazione di plasmacellule maligne all'interno del midollo osseo. Tra i farmaci utilizzati per la cura chemioterapica del mieloma multiplo si trova la Doxorubicina (DOXO).

Al fine di ottimizzare il trattamento con DOXO, è stato recentemente sviluppato un modello compartimentale per lo studio della farmacocinetica (PK) di DOXO in cellule di MM. Il lavoro già svolto assume che la DOXO si distribuisca omogeneamente tra le cellule trattate e le misure non siano affette da errore.

Questa tesi ha l'obiettivo di confrontare le predizioni del modello sviluppato con diversi approcci di popolazione per validare l'assunzione sopra citata, corrispondente all'approccio Naive Average Data, e considerando un errore di misura sui dati descritto da una deviazione standard campionaria. I dati utilizzati per lo studio derivano dalle immagini di esperimenti in vitro, elaborate per ottenere i valori di concentrazione di DOXO all'interno delle cellule, espressi in nM. Essi vengono organizzati in tre dataset differenti, secondo gli approcci Naive Average e Naive Pooled. Per ogni dataset, è stato identificato il modello PK di DOXO, il quale permette di descrivere l'assorbimento di DOXO all'interno delle cellule di MM, considerando anche un meccanismo di farmacoresistenza che regola l'efflusso del farmaco verso l'esterno della cellula. In tutte le analisi, il modello di PK descrive adeguatamente il profilo temporale dei dati di concentrazione intracellulare di DOXO.

Le stime dei parametri risultano simili tra i diversi dataset impiegati e precise in termini di coefficiente di variazione (CV). Tali risultati hanno permesso di concludere che il modello PK proposto descrive in maniera robusta l'assorbimento e distribuzione di DOXO nelle cellule di MM. Tale modello, accoppiato con un opportuno modello di farmacodinamica, rappresenta uno strumento di per il trattamento con DOXO della malattia.

INDICE

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE	1
1.1 Mieloma Multiplo e Doxorubicina	1
1.2 I modelli matematici nel trattamento di MM	3
1.3 Scopo della tesi	4
CAPITOLO 2 - PROTOCOLLO SPERIMENTALE E DATI	5
2.1 Coltura cellulare.....	5
2.2 Esperimenti in vitro e acquisizione delle immagini.....	5
2.3 Elaborazione delle immagini	8
2.4 Preparazione e costruzione del dataset.....	9
CAPITOLO 3 - MODELLO E IDENTIFICAZIONE	13
3.1 Modello di farmacocinetica della doxorubicina	13
3.2 Identificazione del modello	16
CAPITOLO 4 - RISULTATI	19
4.1 Identificazione con WNLS	19
4.2 Identificazione con MAP	21
4.3 Confronto predizioni con MAP	23
CAPITOLO 5 - CONCLUSIONI	25
RIFERIMENTI	27

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Mieloma multiplo e Doxorubicina

Il mieloma multiplo (MM) è una neoplasia ematologica caratterizzata dalla proliferazione di plasmacellule maligne all'interno del midollo osseo, che producono una paraproteina monoclonale. La proliferazione delle plasmacellule nel midollo osseo produce lesioni litiche dello scheletro che portano a dolore osseo e fratture patologiche. Può essere anche responsabile di ipercalcemia, insufficienza renale, infezioni ricorrenti o infezioni ricorrenti [1]. Il mieloma multiplo rappresenta l'1% di tutti i tumori e il 15% delle neoplasie ematologiche [2].

La diagnosi di mieloma multiplo si basa sulle linee guida dell'International Myeloma Working Group e richiede l'identificazione di vari criteri, tra i quali presenza della proteina monoclonale M nel siero e/o nel sangue, quantità nel midollo osseo di clone plasmacellulare oltre al 10% o di un plasmocitoma e danno d'organo (osteolisi, anemia, insufficienza renale, ipercalcemia) [3][4].

La terapia, nel caso di pazienti idonei, prevede il trapianto di cellule staminali autologhe da sangue periferico, combinato a cicli di chemioterapia utilizzando combinazioni di più farmaci per aumentare l'efficacia terapeutica [5].

I risultati migliori sono ottenuti con una combinazione di farmaci utilizzati nella chemioterapia citotossica (come la ciclofosfamide o la doxorubicina) e un nuovo agente immunomodulatore (talidomide o lenalidomide) o un inibitore del proteasoma (ad esempio, bortezomib, carfilzomib o ixazomib) [1].

Tra i vari trattamenti chemoterapici, l'impiego di doxorubicina (DOXO) è ben consolidato e ha mostrato risposte positive nel trattamento del MM [6][7]. La DOXO è un antibiotico

antraciclinico ad azione antineoplastica. Come le altre antracicline, la DOXO interagisce con il DNA attraverso l'intercalazione, cioè si inserisce trasversalmente nel DNA, bloccandone la sintesi e la trascrizione. Questo inibisce la funzione dell'enzima topoisomerasi II, impedendo la ricombinazione del doppio filamento di DNA, arrestandone la replicazione [8][9]. La somministrazione di DOXO nei pazienti avviene per via endovenosa [11].

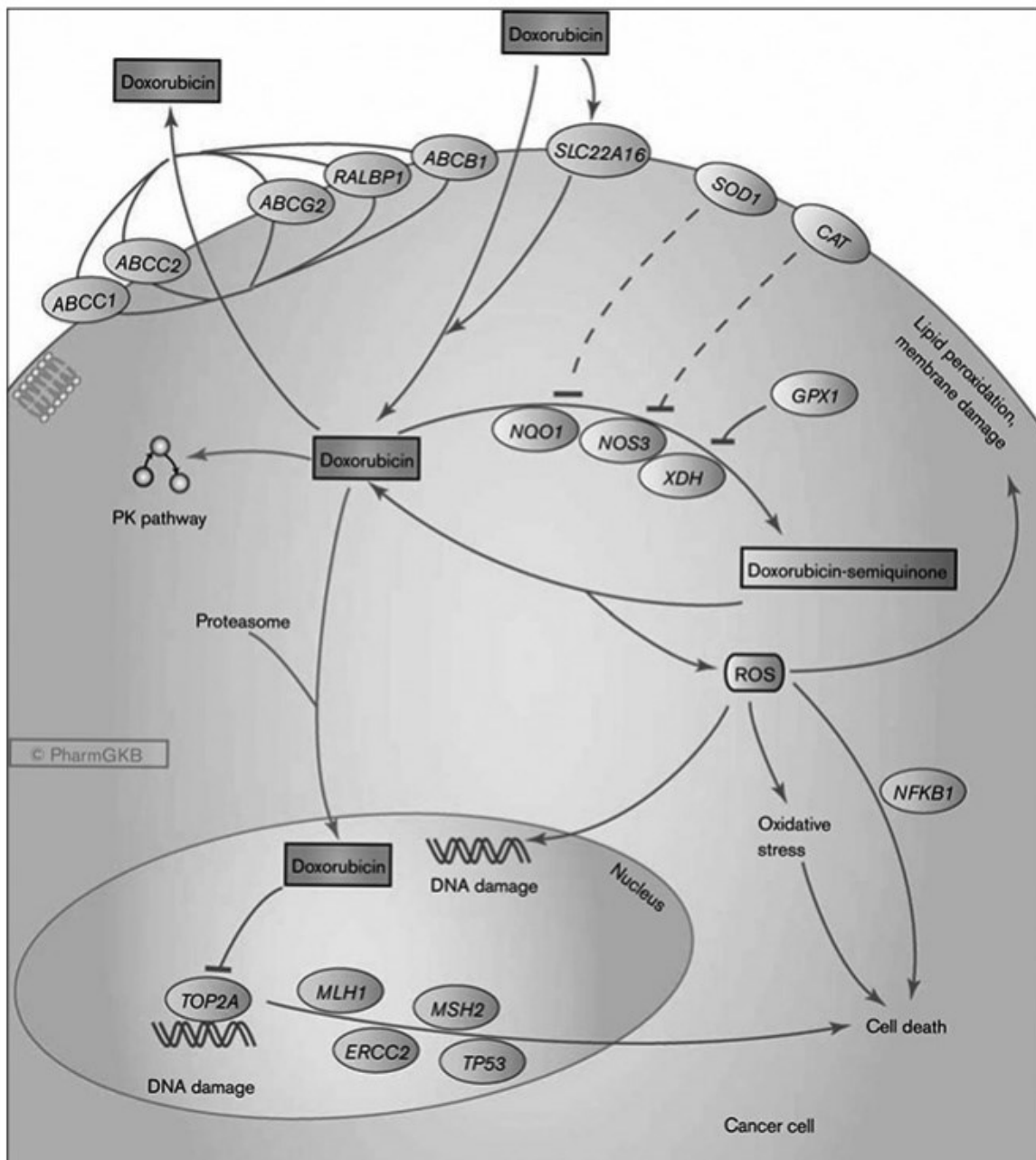


Figura 1.1: Rappresentazione grafica del meccanismo di azione della Doxorubicina. Immagine estratta da [10].

La doxorubicina è una molecola idrofobica che attraversa le membrane cellulari per raggiungere il citoplasma e poi il nucleo. Le cellule presentano una capacità ridotta di accumulare farmaci in conseguenza all'attività di proteine cellulari transmembranarie funzionanti da pompe regolanti l'efflusso del farmaco [12][13]. Questo fenomeno è detto resistenza multipla ai farmaci (MDR), determinata dalla glicoproteina P (Pgp), una proteina transmembranaria, che interviene riducendo i livelli di farmaco intracellulari e conferendo resistenza alle cellule, agendo come pompa di efflusso-energia dipendente [12]. L'effetto delle Pgp si traduce in una diminuzione della quantità di farmaco accumulato nel nucleo [14][15][13][16].

1.2 I modelli matematici nel trattamento del mieloma multiplo

I modelli matematici descrivono, in termini di funzioni ed equazioni, un fenomeno di interesse. In particolare, i modelli farmacocinetici/farmacodinamici (PK/PD) studiano la cinetica all'interno dell'organismo e i meccanismi d'azione del farmaco. Essi sono validi perché permettono di predire l'effetto e l'efficacia nel tempo del dosaggio somministrato.

Combinare i modelli matematici di predizione con la ricerca biologica è il metodo migliore per conoscere, descrivere e predire l'andamento di un determinato farmaco nell'organismo. Per quanto riguarda i trattamenti con DOXO, ad esempio, è stato recentemente sviluppato un modello che descrive la farmacocinetica di DOXO in cellule di cancro al seno [10]. Brevemente, tale modello permette di studiare la risposta cellulare al farmaco e attraverso la stima dei suoi parametri rende disponibile una predizione della concentrazione di DOXO nel tempo.

Un simile approccio è stato recentemente proposto anche per lo studio della farmacocinetica di DOXO in cellule di MM [14]. È stato sviluppato e identificato il modello su due linee cellulari di MM (MM1R e MOLP-2) e due dosaggi. Tuttavia, a causa di limiti legati al setup sperimentale, in tale studio non è stato possibile seguire l'andamento nel tempo della concentrazione di DOXO nelle stesse cellule. Pertanto, al fine di ottenere un profilo di

concentrazione del farmaco nel tempo, si è assunto che la DOXO si distribuisse uniformemente tra le varie cellule esposte a trattamento, e ad ogni istante temporale le concentrazioni misurate tra le cellule sono state mediate, seguendo un approccio Naive Average Data (NAD).

1.3 Scopo della tesi

Questa tesi ha lo scopo di valutare la robustezza del modello di DOXO sviluppato a partire dalle assunzioni descritte precedentemente. A tal fine, in questo lavoro si confrontano i risultati delle identificazioni del modello ottenute con vari approcci di popolazione, permettendo di verificare se le dinamiche di popolazione vengano adeguatamente catturate anche se si utilizzano i dati medi.

In particolare, il fit del modello avverrà su ulteriori due set di dati oltre a quelli organizzati secondo il già proposto approccio NAD. Si dispone dell'andamento temporale delle medie delle concentrazioni intracellulari di DOXO all'interno dello stesso campo di acquisizione e nello stesso esperimento, necessari per sviluppare degli approcci Naive Pooled Data (NPD).

Si prevede anche di implementare gli studi precedenti proponendo che le misure sperimentali siano affette da errore descritto da una standard deviation campionaria, calcolata a partire dagli stessi dati.

I capitoli che seguono forniranno dapprima una descrizione del protocollo sperimentale e della raccolta e organizzazione dei dati (*Capitolo 2*), successivamente verrà illustrato il modello della farmacocinetica di DOXO e la sua identificazione (*Capitolo 3*) e i risultati ottenuti (*Capitolo 4*). Infine, un capitolo conclusivo (*Capitolo 5*) presenterà una discussione dell'attività svolta, evidenziandone i vantaggi, le limitazioni e i possibili sviluppi futuri.

CAPITOLO 2

PROTOCOLLO SPERIMENTALE E DATI

Nel presente capitolo viene esposto il procedimento dell'esperimento *in vitro*, da cui vengono ricavati i dati utilizzati nello studio. Successivamente viene illustrato come questi siano stati organizzati nei diversi dataset.

2.1 Coltura cellulare

I dati utilizzati per l'analisi della farmacocinetica della doxorubicina derivano da esperimenti *in vitro* condotti in cellule di mieloma multiplo. Nello specifico, sono state impiegate cellule MM1R, fornite dall'American Type Culture Collection (ATCC, <http://www.atcc.org>). MM1R (ATCC CRL-2975) è una linea cellulare linfoblastoide, isolata nel 1990 dal sangue periferico di una donna nera di 42 anni affetta da mieloma multiplo e diventata resistente alla terapia a base di steroidi [17]. Questa linea è un subclone resistente agli steroidi derivato dalle cellule MM1S, esposte cronicamente al desametasone (Dex).

Le cellule MM1R sono state coltivate a una densità di 5×10^5 cellule/mL in terreno di coltura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1641 arricchito con 1% di penicillina/streptomicina e 10% di siero fetale bovino (FBS).

2.2 Esperimenti *in vitro* e acquisizione delle immagini

Per caratterizzare l'assorbimento della doxorubicina nelle cellule MM1R è stata impiegata la tecnica di microscopia a fluorescenza.

La doxorubicina è caratterizzata da proprietà di autofluorescenza (in rosso in Figura 2.1), con picchi di eccitazione e emissione a rispettivamente 470nm e 570nm [18]. Sfruttando tale

proprietà, tramite microscopio a fluorescenza (Nikon® Eclipse T1-U), è possibile monitorare l'assorbimento di DOXO da parte delle cellule MM1R e quindi il trasporto del farmaco dallo spazio extra- a quello intra-cellulare.

Il monitoraggio della concentrazione intracellulare di DOXO è stato eseguito in due esperimenti *in vitro*, in cui il farmaco è stato somministrato a due dosaggi differenti: 200 nM o 450 nM. Per ogni esperimento, 2.5×10^5 cellule MM1R sono state poste in sospensione all'interno di 500 μ L di soluzione tampone fosfato salino (PBS), 20% di FBS, a 37°C. Successivamente, le cellule sono state sottoposte ad un trattamento di DOXO (in concentrazione 200 nM o 450 nM) della durata di 3 ore (fase di assorbimento). Per entrambi gli esperimenti, il tempo $t = 0$ ore corrisponde all'istante di somministrazione della DOXO.

Subito dopo la somministrazione di DOXO, 200 μ L contenenti 10^5 cellule sono stati prelevati e piastrati in due pozzetti μ -Slide VI^{0.4} (ibidi GmbH, Grafelfing, DE), ognuno contenente 100 μ L con 5×10^4 cellule, al fine di ottenere misure in duplicato. Per ogni pozzetto sono state acquisite 4-5 immagini a 40x attraverso microscopia in campo chiaro e in fluorescenza (Figura 2.1).

L'acquisizione delle immagini è stata ripetuta ogni 20 minuti per 3 ore.

Nel seguito della tesi, il primo e il secondo pozzetto verranno identificati con l'etichette *Esperimento 1* ed *Esperimento 2*, rispettivamente, mentre l'*etichetta Campo X* identificherà ognuna delle 4-5 immagini rilevate (per ciascuno dei 2 esperimenti si avranno quindi dai 4 ai 5 campi).

Al tempo $t = 3$ ore, le cellule rimanenti sono state centrifugate, allo scopo di rimuovere la DOXO presente nello spazio extracellulare e monitorare nelle successive 5 ore la fase di rilascio del farmaco da parte delle cellule.

Dopo un ulteriore lavaggio, il pellet cellulare è stato risospeso in 300 μ L di PBS, 20% FBS, per ottenere una densità di 5×10^4 cellule/100 μ L. Il materiale cellulare è stato quindi prelevato e

seminato in tre pozzetti della stessa tipologia usata nella fase precedente, ognuno contenente 100 μL con 5×10^4 cellule, al fine di ottenere misure in triplicato. Analogamente alla fase di assorbimento, per ogni pozzetto sono state acquisite 4-5 immagini a 40x attraverso microscopia in campo chiaro e in fluorescenza, rispettivamente ai tempi $t = [3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8]$ ore. Per distinguere ogni pozzetto da quelli della fase di assorbimento ed evidenziarne la successione temporale, anche per la fase di rilascio verranno utilizzate le etichette *Esperimento 3*, *Esperimento 4* e *Esperimento 5*, ognuno dei quali conterrà 4-5 immagini (*Campi*). Per riassumere, *Esperimento 1* e *2* faranno riferimento alla fase di assorbimento ed ognuno raggrupperà dai 4 ai 5 campi, corrispondenti a ciascuna immagine acquisita. Allo stesso modo

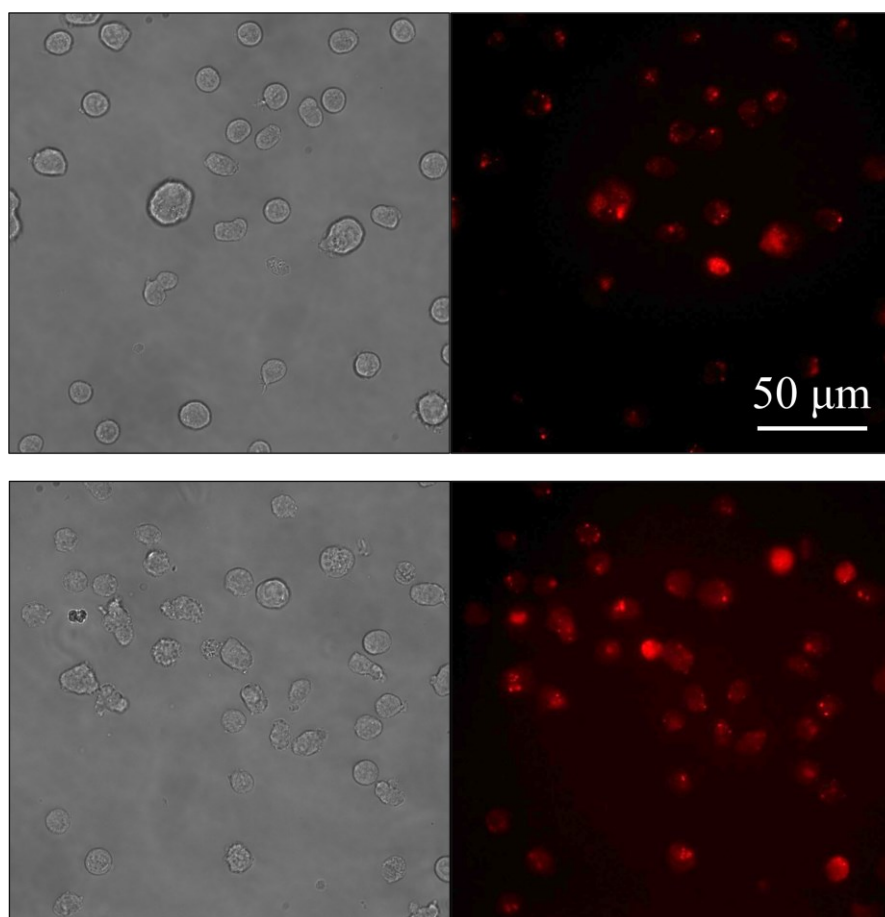


Figura 2.1: acquisizione delle immagini in campo chiaro (a sinistra), fluorescenza (a destra), eseguiti a $t = 20$ min (in alto) e a $t = 160$ min (in basso) dopo la somministrazione di 450 nM di DOXO in cellule MMIR.

si organizzano i dati della fase di rilascio con la differenza che i pozzetti utilizzati sono 3, quindi si farà riferimento a ciascuno di essi come *Esperimento 3, 4 e 5*.

2.3 Elaborazione delle immagini

La relazione tra intensità di fluorescenza e concentrazione di DOXO permette di derivare la seconda conoscendo prima. Le concentrazioni sono ottenute dall'intensità usando una curva standard. La curva standard, o curva di calibrazione, è il grafico che permette di osservare come l'intensità di fluorescenza cambi con la concentrazione di DOXO. È necessario quindi trovare la relazione lineare che vi è tra essi.

Il processo di identificazione dell'equazione che spiega la relazione tra le due misure necessita della conoscenza dell'intensità di fluorescenza che corrisponde ad una certa concentrazione: si procede quindi analizzando la fluorescenza data dal carico in serie di DOXO in concentrazioni note (C), da 100 nM a 1600 nM. Le immagini sono state acquisite attraverso microscopia a fluorescenza, con le stesse linee guida descritte sopra, e tramite il software ImageJ si sono ottenute le misure dell'intensità di fluorescenza (Int). Ad Int si è dovuto sottrarre il segnale di fondo (Background), cioè l'intensità del fondo nel caso di concentrazione nulla di DOXO.

Infine, è stato applicato un modello di regressione lineare ai dati C-Int (Figura 2.2), ottenendo così l'equazione che descrive la relazione tra l'intensità di fluorescenza di DOXO e la sua concentrazione:

$$\text{Int} = 15,256 * C \quad (2.1)$$

Allo stesso modo, è stata operata l'elaborazione e l'analisi delle immagini in fluorescenza derivate dalle rilevazioni svolte nelle fasi di assorbimento e rilascio, ricavando le corrispondenti intensità di fluorescenza cellulare. Su queste immagini vengono inoltre rilevate le intensità cellulari di ogni singola cellula, tramite l'individuazione dei confini cellulari con segmentazione e l'utilizzo della microscopia in campo chiaro. La concentrazione intracellulare

di DOXO è stata ricavata quindi dall'equazione (2.1) a cui è stato sottratto un termine per tenere conto del contributo della DOXO libera. L'equazione utilizzata risulta quindi essere:

$$C = \frac{Int - 508.66}{15.256} \quad (2.2)$$

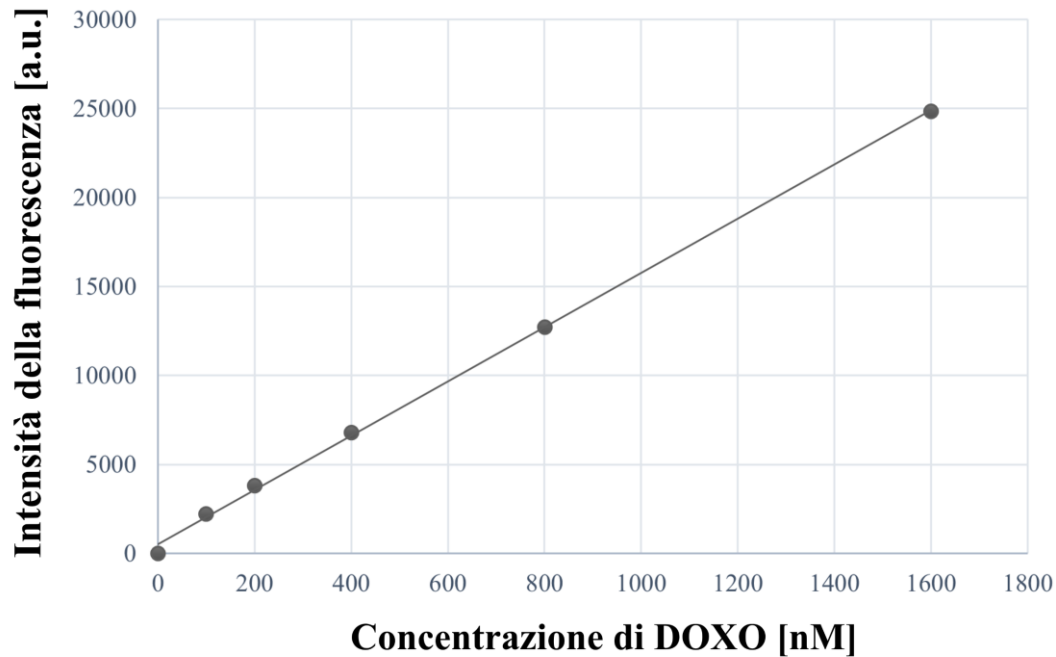


Figura 2.2: Modello di regressione lineare per determinare la relazione tra concentrazione di DOXO e intensità di fluorescenza.

2.4 Preparazione e costruzione dei dataset

A valle dell'acquisizione delle immagini, è stato osservato che i valori di concentrazione per la fase di rilascio erano paradossalmente più elevati rispetto a quelli della fase di assorbimento, in conseguenza ad una più elevata intensità di fluorescenza rilevata. Tale fenomeno è verosimilmente riconducibile ad errori di tipo sperimentale. Pertanto, per correggere l'inconsistenza nei dati, è stata operata una normalizzazione dei dati della fase di rilascio.

In particolare, il fattore di normalizzazione con cui si dividono i valori della fase di rilascio è stato assunto pari al rapporto tra la concentrazione massima di rilascio iniziale rilevata al tempo $t = 3,5$ ore e la concentrazione media di fine assorbimento calcolata a $t = 3$ ore.

Per la fase di assorbimento si conoscono le concentrazioni relative ad ogni cellula, le quali sono raggruppate in 4-5 campi e a loro volta corrispondenti agli *Esperimento 1* e *2*. Analogamente, per la fase di rilascio sono disponibili le concentrazioni intracellulari di ogni cellula divise nei 4-5 campi e relativi agli *Esperimento 3-5*.

È quindi possibile dividere i dati di concentrazione intracellulare in base al campo ed esperimento di acquisizione.

In questa tesi sono stati definiti e impiegati tre specifici dataset:

- *Dataset 1 (NAD)*: per ogni dosaggio (200 nM o 450 nM), i dati di concentrazione di tutte le cellule vengono mediati ad ogni istante temporale. Ciò corrisponde a considerare i dati secondo un approccio di tipo Naive Average.
- *Dataset 2 (NPDe)*: per ogni dosaggio (200 nM o 450 nM), i dati di concentrazione di tutte le cellule appartenenti a uno stesso esperimento vengono mediati ad ogni istante temporale. Ciò corrisponde a considerare i dati secondo un approccio di tipo Naive Pooled dipendente dall'esperimento.
- *Dataset 3 (NPDc)*: per ogni dosaggio (200 nM o 450 nM), i dati di concentrazione di tutte le cellule appartenenti a uno stesso campo vengono mediati ad ogni istante temporale. Ciò corrisponde a considerare i dati secondo un approccio di tipo Naive Pooled dipendente dal campo.

Per ogni dataset appena definito, sono state calcolate le rispettive deviazioni standard (standard deviation, SD), che specifica la variabilità della popolazione di dati, ed errore standard (standard error, SE), che indica quanto l'accuratezza della media del campione rappresenta la vera media della popolazione.

Nello specifico, le SD sono calcolate:

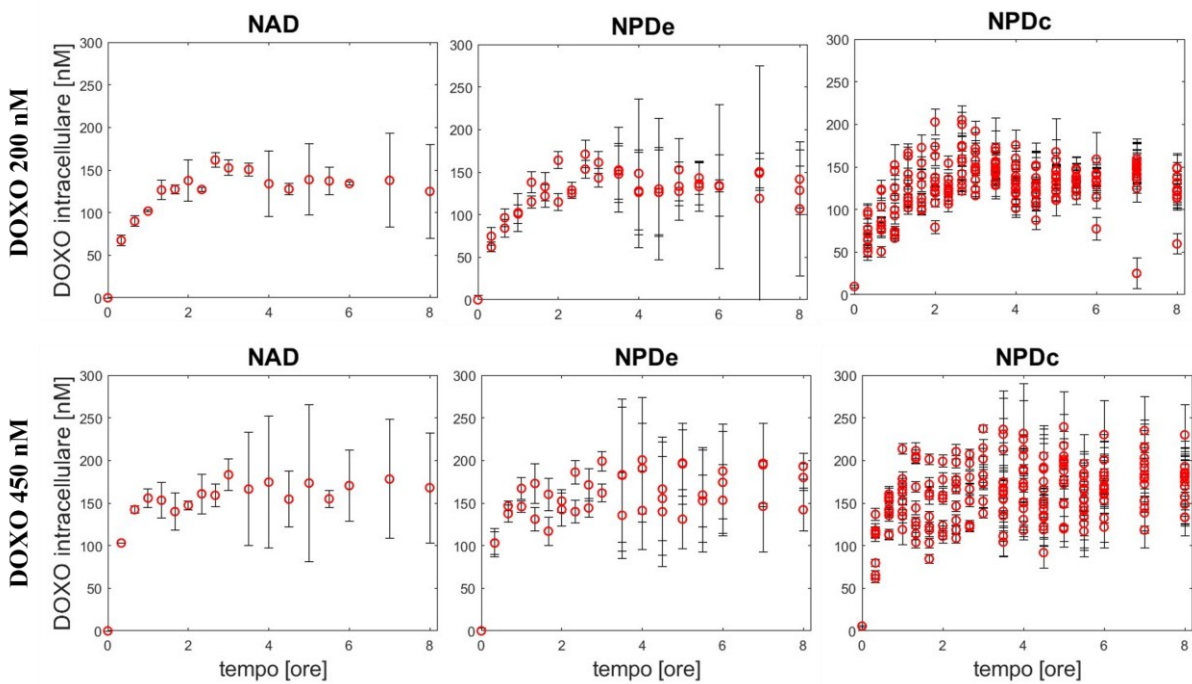


Figura 2.3: Andamento temporale delle concentrazioni intracellulari di DOXO ottenuti in seguito a somministrazione del farmaco a dosaggio 200 nM (sopra) e 450 nM (sotto), rispettivamente per i dataset NAD (sinistra) NPDe (centro) NPDe (destra). I dati di concentrazione sono indicati con cerchietti rossi, mentre le barre d'errore rappresentano l'errore standard (SE).

- per il *Dataset 1*, come SD delle concentrazioni medie di ogni esperimento, per ogni istante temporale;
- per il *Dataset 2*, come SD delle concentrazioni medie di tutti i campi appartenenti ad uno specifico esperimento, per ogni istante temporale;
- per il *Dataset 3*, come SD delle concentrazioni medie di tutte le cellule appartenenti ad uno specifico campi, per ogni istante temporale.

L'errore standard viene calcolato dividendo la SD per la radice del numero di campioni su cui è stato effettuato il calcolo della SD.

L'andamento delle concentrazioni intracellulari di DOXO ottenuto per i tre dataset è mostrato in Figura 2.3.

CAPITOLO 3

MODELLO E IDENTIFICAZIONE

Nel presente capitolo viene presentato il modello matematico farmacocinetico utilizzato per valutare nel tempo la concentrazione intracellulare della doxorubicina. Una volta sviluppato il modello PK, si procede alla sua identificazione con il software Matlab.

3.1 Modello di farmacocinetica della doxorubicina

Per descrivere l'andamento della concentrazione intracellulare di DOXO a seguito della sua somministrazione, si considera un modello compartimentale sviluppato a partire da studi *in vitro* che descrivono la PK della DOXO.

L'impiego di un modello compartimentale permette di descrivere i flussi di scambio di DOXO tra gli spazi intra- ed extra-cellulare. Infatti, è ragionevole attendersi che, a seguito della somministrazione di DOXO, questa venga assorbita dalle cellule, con conseguente aumento della concentrazione intracellulare; viceversa, a seguito della rimozione del farmaco dal mezzo di coltura, si suppone che la DOXO non ancora legata al DNA fuoriesca in una certa quantità dal compartimento intracellulare per tornare nello spazio extracellulare.

Ad esempio, nel contesto del tumore al seno, è stato proposto un modello che assume che la DOXO entri nelle cellule per diffusione, una volta nella cellula venga traslocata nel nucleo e che venga effluita dalla cellula all'esterno [11].

Le equazioni che descrivono tale modello sono le seguenti:

$$\begin{cases} \dot{X}_E(t) = k_{EF}(t) * \frac{V_I}{V_E} * X_F(t) - k_{FE} * X_E(t) + u(t) & X_E(0) = 0 \\ \dot{X}_F(t) = k_{FE} * \frac{V_E}{V_I} * X_E(t) - k_{EF}(t) * X_F(t) - k_{BF} * X_F(t) & X_F(0) = 0 \\ \dot{X}_B(t) = k_{BF} * X_F(t) & X_B(0) = 0 \end{cases} \quad (3.1)$$

$$X_I(t) = X_F(t) + X_B(t) \quad (3.2)$$

dove X_E e X_I rappresentano le concentrazioni extra- e intra-cellulari di DOXO al tempo t espresse in nM.

Una variante dello stesso modello è stato recentemente proposto per descrivere la farmacocinetica di DOXO in cellule di MM [14], la quale prevede un controllo sul flusso di uscita di DOXO dal compartimento intracellulare a quello extracellulare.

X_F è la concentrazione libera di DOXO nel citoplasma, e $X_B(t)$ è la concentrazione di farmaco legato al DNA nel nucleo.

Il transito di DOXO tra i vari compartimenti è descritto dai parametri k_{ij} espressi in hr^{-1} , ossia le costanti di velocità che descrivono il passaggio del farmaco dal compartimento j a quello i . Nello specifico, k_{FE} e k_{BF} sono indipendenti dal dosaggio del farmaco, tempo-invarianti e descrivono il transito di DOXO dal compartimento extracellulare al citoplasma e dal compartimento intracellulare libero al nucleo, rispettivamente. La velocità di uscita dal citoplasma allo spazio extracellulare è invece descritta dal parametro tempo-variante $k_{EF}(t)$. In particolare, si assume un fenomeno di resistenza al farmaco dipendente dalla concentrazione del farmaco stesso.

Tale fenomeno viene descritto mediante un meccanismo di soglia e saturazione, modellato con l'equazione di Hill (3.3) che mette in relazione la concentrazione e la sua cinetica [19]:

$$k_{EF}(t) = \frac{V_{maxEF} * X_B(t)^{q-1}}{K_{maxEF}^q + X_B(t)^q} \quad (3.3)$$

dove K_{maxEF} (nM) corrisponde alla concentrazione intracellulare di $X_B(t)$ a cui $k_{EF}(t)$ è uguale al 50% del suo valore massimo V_{maxEF} (nM/hr). Il parametro q rappresenta il coefficiente di Hill, che determina la velocità della transizione e la pendenza della curva della risposta alla dose. Il modello in questione assume $q = 2$. Si nota che, nel caso di $q = 1$, l'equazione di Hill corrisponde all'equazione di Michaelis-Menten.

I parametri V_E e V_I rappresentano, nell'ordine il volume dello spazio extra- ed intra-cellulare.

L'input $u(t)$ è definito come:

$$u(t) = \begin{cases} D * \delta(t) & t = 0 \\ 0 & \text{altrimenti} \end{cases}$$

con D uguale alla dose di DOXO somministrata e $\delta(t)$ delta di Dirac usato per esprimere l'impulsività della somministrazione. La dose D si ipotizza quindi venga somministrata istantaneamente al tempo $t = 0$ ore. Il modello non tiene conto della degradazione del farmaco, poiché la sua emivita ($t_{1/2}$), pari a 17 ore [20], non è monitorabile negli esperimenti considerati (di durata pari a 8 ore), peraltro condotti *in vitro*.

Si assume che il modello abbia come output $X_I = X_B + X_F$ e come input il valore conosciuto di D (cioè 200 o 450 nM).

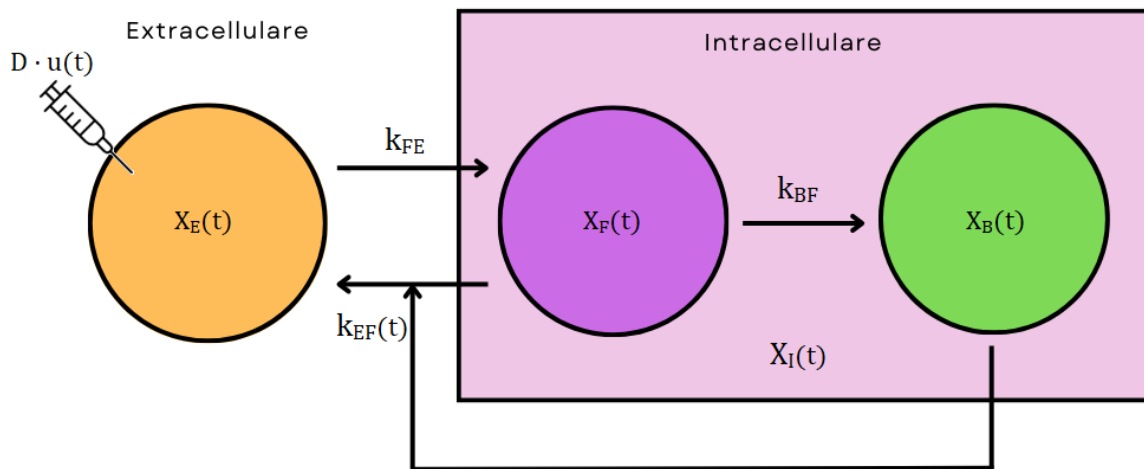


Figura 3.1: Diagramma del modello di PK di DOXO. D (nM), dose di DOXO somministrata; X_E , X_I , X_F , X_B , (nM), concentrazioni di DOXO nello spazio extracellulare e intracellulare (diviso in citoplasma e nucleo, rispettivamente); k_{FE} (hr^{-1}), k_{BF} (hr^{-1}), costanti di velocità; $k_{EF}(t)$ (hr^{-1}), definita come un parametro tempo-variante dipendente da $X_B(t)$.

3.2 Identificazione del modello

Una volta determinate le equazioni del modello PK che spiega al meglio il comportamento del sistema sulla base di conoscenze precedenti, si procede all'identificazione dello stesso e quindi alla stima dei parametri ottimi.

Il modello non è univocamente identificabile a priori, nello specifico esistono infinite coppie di V_E e V_I che permettono di descrivere i dati. Tuttavia, tramite determinate assunzioni è possibile identificare un'unica combinazione di parametri. In particolare, a partire da informazioni relative al setup sperimentale, il valore di V_E è stato fissato a 100 μL , mentre V_I è stato calcolato moltiplicando il numero di cellule totali (5×10^4) per il volume di una cellula. La cellula viene ipotizzata come sferica quindi $V_I = \frac{4}{3}\pi \times \left(\frac{d}{2}\right)^3$ [μL] con d diametro della cellula pari a 13.9×10^{-3} . Sotto tali assunzioni il modello di parametri incogniti $\theta = [k_{FE}, V_{\max EF}, K_{\max EF}, k_{BF}]$ risulta localmente identificabile, in quanto il problema di stima ammette due possibili soluzioni aventi lo stesso $K_{\max EF}$ ma di segno opposto. Tuttavia, rappresentando $K_{\max EF}$ una concentrazione, l'unica soluzione ammissibile è quella avente $K_{\max EF} > 0$. Pertanto, sotto tali assunzioni, il modello viene considerato globalmente identificabile a priori.

L'identificazione del modello, e quindi la stima dei parametri incogniti, è stata operata andando a considerare il vettore dei dati $y(t) = X_I(t)$ contenente i valori di concentrazione intracellulare misurati.

L'errore di misura sui dati è assunto noto, additivo gaussiano e descritto da una standard deviation (SD) campionaria, ottenuta come riportato nel capitolo 2.4. La dose di DOXO somministrata alle cellule rappresenta l'input del sistema, assunto noto e privo di errore di misura. In particolare, come riportato nel capitolo precedente, è stato possibile considerare tre diversi set di dati, e quindi tre differenti approcci di identificazione del modello.

Il primo approccio utilizzato è il Naive Average Data (NAD), che permette di ottenere la stima dei parametri fittando il modello sui dati medi. Nel caso di NAD, $y(t)$ è il *Dataset 1*.

Per ampliare le trattazioni delle identificazioni già effettuate, si amplia lo studio con un ulteriore approccio oltre al NAD.

L'approccio Naive Pooled Data (NPD), invece, considera tutti i dati come appartenenti ad un unico soggetto. Si considera un unico vettore dati per tutta la popolazione, contenente ogni misura della concentrazione intracellulare di DOXO ottenuta per tutte le cellule. Per questo approccio, si utilizzano i *Database 2 e 3*.

Il modello della misura per il compartimento intracellulare è $\hat{y} = \hat{X}_I(t; \theta)$, dove θ è il vettore dei parametri incogniti e $\hat{X}_I(t; \theta)$ rappresenta la predizione del modello.

Il problema di stima dei parametri è stato affrontato impiegando due diversi metodi di minimizzazione.

Il primo metodo utilizzato è quello dei minimi quadrati pesati non lineari (WNLS), che permette di stimare il vettore dei parametri ottimi $\hat{\theta}_{WNLS}$ mediante la funzione:

$$\hat{\theta}_{WNLS} = \underset{\theta}{\operatorname{argmin}} WRSS(\theta) = \underset{\theta}{\operatorname{argmin}} \|X_I(t) - \hat{X}_I(t; \theta)\|_{\Sigma_v}^2$$

dove WRSS è la somma dei quadrati dei residui pesati. I residui pesati $wres$ sono calcolati come $wres = \frac{y(t) - \hat{y}(t)}{SD}$, ossia come differenza tra i dati di concentrazione intracellulare di DOXO e la predizione del modello, pesata per la SD dei dati.

Come sarà osservato nel capitolo successivo, l'approccio ai minimi quadrati pesati non garantisce una stima affidabile dei parametri $V_{\max EF}$ e $K_{\max EF}$, poiché il range esplorato dai dati non permette di identificare propriamente il modello di Hill.

Per ovviare a tale problema, si è scelto di implementare un secondo approccio, basato sullo stimatore massimo a posteriori (MAP). In questo caso, il vettore dei parametri ottimi $\hat{\theta}_{MAP}$ viene calcolato come segue:

$$\begin{aligned} \hat{\theta}_{MAP} &= \underset{\theta}{\operatorname{argmin}} (WRSS(\theta) + (\mu \Sigma)) \\ &= \underset{\theta}{\operatorname{argmin}} [\|y - \hat{X}_I(t; \theta)\|_{\Sigma_v}^2 + (\theta - \mu_\theta)' \Sigma^{-1} (\theta - \mu_\theta)] \end{aligned}$$

dove il secondo addendo prende il nome di informazione *a priori* e rappresenta la distanza del vettore dei parametri stimati dalla distribuzione di riferimento, descritta da un vettore media μ_θ e una matrice di covarianza Σ_p . In questa tesi, è stata assunta un'informazione *a priori* sui parametri $V_{\max EF}$, $K_{\max EF}$. Pertanto, μ_θ e Σ_p sono definiti nella maniera seguente:

$$\mu_\theta = \begin{bmatrix} 0 \\ \mu_{V_{\max EF}} \\ \mu_{K_{\max EF}} \\ 0 \end{bmatrix} \quad \Sigma_p = \begin{bmatrix} \text{inf} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \text{var}_{V_{\max EF}} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \text{var}_{K_{\max EF}} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \text{inf} \end{bmatrix}$$

dove i valori di $\mu_{V_{\max EF}} = 2.646 \times 10^5 \text{ hr}^{-1}$, $\mu_{K_{\max EF}} = 1.328 \times 10^3 \text{ hr}^{-1}$, $\text{var}_{V_{\max EF}} = 1.13 \times 10^9 (\text{hr}^{-1})^2$ e $\text{var}_{K_{\max EF}} = 7.22 \times 10^3 (\text{hr}^{-1})^2$ sono stati ricavati da uno studio precedente [18].

Lo scopo in entrambi gli stimatori è quello di minimizzare la funzione obiettivo, cioè l'argomento di *argmin*, per poter raggiungere una migliore stima dei parametri incogniti. Entrambi gli stimatori sono stati implementati in Matlab R2022a (Natick, MA), usando la funzione *lsqnonlin* (assumendo tolleranze $\text{ToI}X = 10^{-6}$ e $\text{ToIFun} = 10^{-6}$) e integrando le equazioni differenziali tramite la funzione *ode45*. Per entrambi gli approcci, i valori iniziali dei parametri sono derivati dai risultati di un precedente studio [14].

La bontà del modello e delle stime dei parametri è stata valutata in termini di fit e precisione di stima. Quest'ultima è valutata per mezzo dei coefficienti di variazione percentuale (CV %).

Il CV si ottiene dal rapporto tra la deviazione standard (SD_p) dei parametri stimati e i valori dei parametri stimati (\hat{p})

$$CV\% = \frac{SD_p}{\hat{p}} * 100$$

SD_p e \hat{p} derivano dagli output della funzione *lsqnonlin*: SD_p è ottenuto dall'inversa della matrice dell'informazione di Fisher.

Se il CV% risulta inferiore al 100% allora la stima viene giudicata affidabile.

CAPITOLO 4

RISULTATI

In questo capitolo, vengono illustrati i risultati ottenuti con l'identificazione con stima WNLS e MAP e si confrontano graficamente le predizioni e i dati sperimentali dei tre approcci. Si presentano poi le predizioni delle concentrazioni intracellulari nei compartimenti citoplasmatico e nucleare per il caso di stima MAP, in conseguenza della validità dei risultati ottenuti.

4.1 Identificazione con stima WNLS

I fit del modello sui *Dataset 1-3* per entrambi i dosaggi di DOXO (200 nM e 450 nM) sono riportati in Figura 4.1. Come si può osservare, il modello di PK descrive adeguatamente il

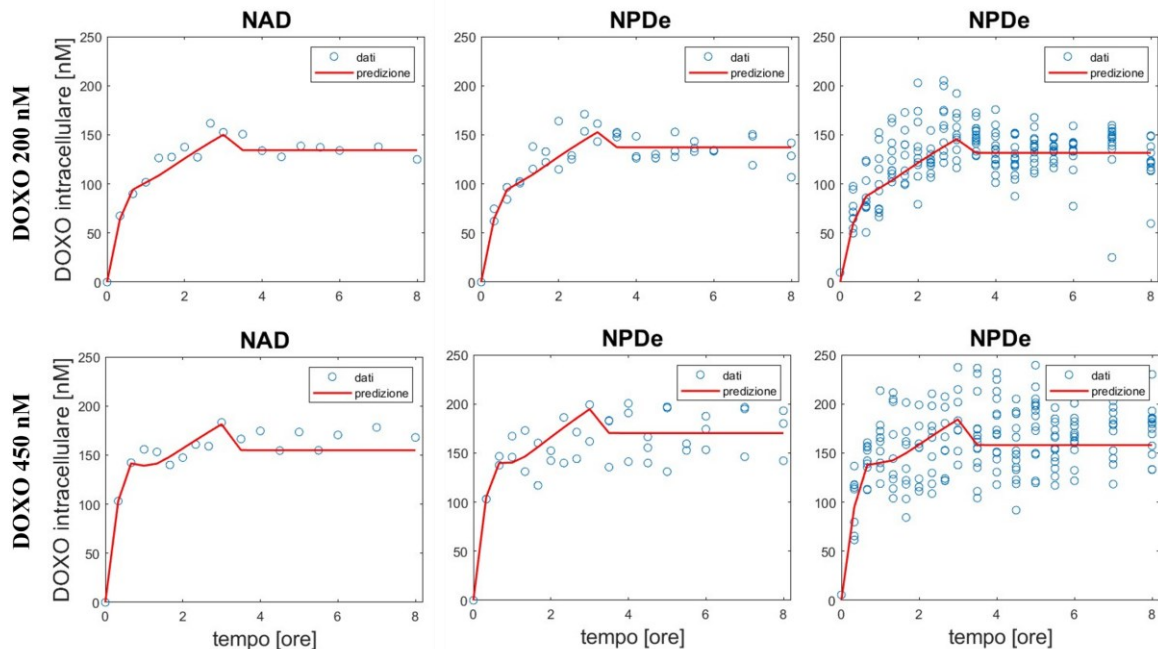


Figura 4.1: Confronto tra predizione del modello ottenuta con stimatore WNLS (in rosso) e dati di concentrazione intracellulare (in blu) di DOXO per i dataset NAD (sinistra) NPDe (centro) NPDe (destra) ottenuti a seguito della somministrazione di DOXO a 200 nM (sopra) e 450 nM (sotto).

profilo temporale dei dati di concentrazione intracellulare di DOXO a seguito della somministrazione di entrambi i dosaggi. In particolare, si nota che l'identificazione del modello sui dati del *Dataset 1* fornisce una leggera sottostima dei campioni al picco nell'esperimento a 200 nM, e una sottostima della fase di rilascio nell'esperimento a 450 nM, principalmente dovuto a una più ampia dispersione (SD) in quei tempi. Viceversa, nel caso dei *Dataset 2* e *3*, la predizione del modello ad ogni istante temporale si colloca all'interno delle distribuzioni dei dati.

Le stime dei parametri sono riportate in Tabella 4.1.

Nello specifico, si osserva che i parametri k_{FE} e k_{BF} sono più lenti quando la dose somministrata è maggiore, a differenza di V_{maxEF} e K_{maxEF} , che risultano invece più lenti per il dosaggio minore. I parametri appaiono comunque negli stessi ordini di grandezza nei due dosaggi, ad eccezione di V_{maxEF} , il quale, per il *Dataset 2*, risulta doppiamente più veloce dello stesso parametro stimato con il *Dataset 3*.

Tuttavia, la precisione di stima non risulta soddisfacente, in particolare per V_{maxEF} e K_{maxEF} si ottengono CV dell'ordine di 10^4 , per entrambi i dosaggi.

Dosaggio DOXO	Approccio	k_{FE} (hr^{-1})	V_{maxEF} (hr^{-1})	K_{maxEF} (hr^{-1})	k_{BF} (hr^{-1})
200 nM	NAD	$7.3362 \cdot 10^{-4}$ (15.57%)	$6.9584 \cdot 10^5$ (28101%)	$2.9719 \cdot 10^3$ (14054%)	1.4454 (21.3%)
	NPDe	$7.3627 \cdot 10^{-4}$ (20.15%)	$5.4563 \cdot 10^5$ (43634%)	$2.6363 \cdot 10^3$ (21830%)	1.50507 (41.02%)
	NPDe	$6.7974 \cdot 10^{-4}$ (61.2%)	$2.4495 \cdot 10^5$ (48154%)	$1.7253 \cdot 10^3$ (24098%)	1.5858 (110.21%)
450 nM	NAD	$5.2723 \cdot 10^{-4}$ (1.37%)	$9.8425 \cdot 10^5$ (53909%)	$3.7137 \cdot 10^3$ (26965%)	0.9988 (27.6%)
	NPDe	$5.4783 \cdot 10^{-4}$ (24.3%)	$1.4055 \cdot 10^6$ (53007%)	$4.411 \cdot 10^3$ (26513%)	1.1876 (25.9%)
	NPDe	$4.7743 \cdot 10^{-4}$ (28.44%)	$6.685 \cdot 10^5$ (55994%)	$3.2629 \cdot 10^3$ (28016%)	1.0335 (38.92%)

Tabella 4.1: Parametri stimati con stimatore WNLS e loro precisione espressa come CV% tra parentesi.

4.2 Identificazione con stima MAP

I fit del modello sui *Dataset 1-3* per entrambi i dosaggi di DOXO (200 nM e 450 nM) sono riportati in Figura 4.2. Anche con questa stima, il modello di PK traccia opportunamente l'andamento della concentrazione intracellulare del farmaco per entrambi i dosaggi.

Nello specifico, si mantengono le stesse sottostime rilevate con l'uso dello stimatore WNLS, dovuto a SD elevate in corrispondenza degli istanti temporali corrispondenti alle sottostime. Inoltre, l'identificazione del modello sui dati del *Dataset 2* non aderisce ai campioni nella prima fase di assorbimento a 450 nM e presenta una leggera sottostima per i campioni della fase di assorbimento a 200 nM.

Nel caso di *Dataset 3* la predizione del modello ad ogni istante temporale si colloca all'interno della distribuzione dei dati.

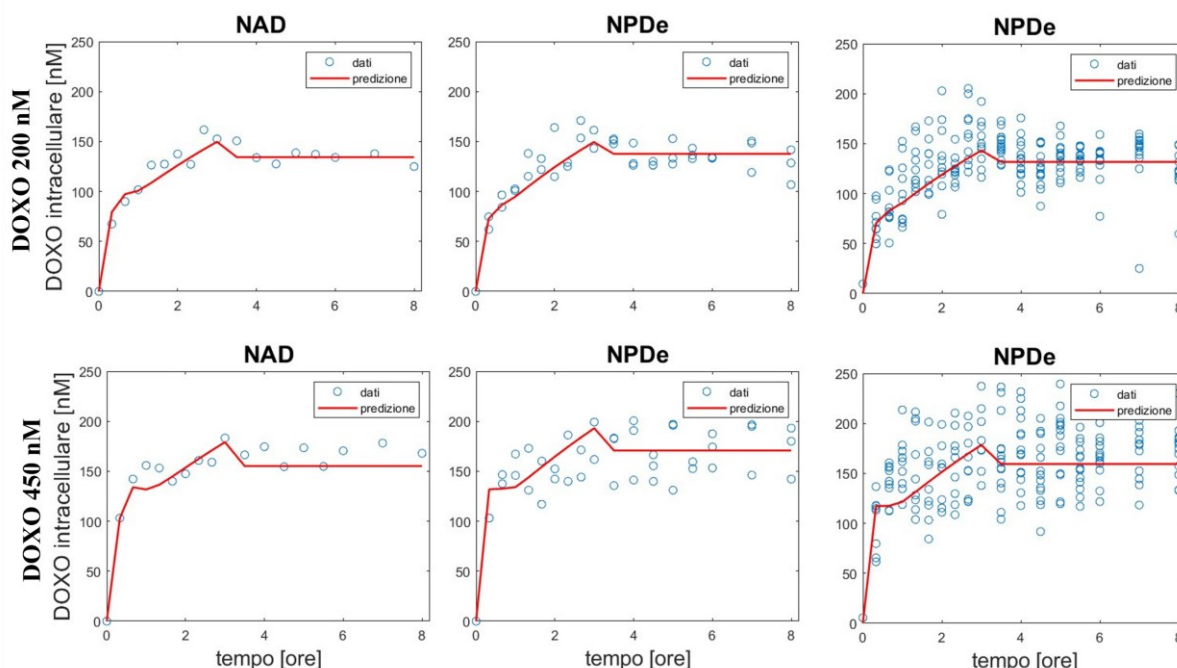


Figura 4.2: Confronto tra predizione del modello ottenuta con stimatore MAP (in rosso) e dati di concentrazione intracellulare (in blu) di DOXO per i dataset NAD (sinistra) NPDe (centro) NPDe (destra) ottenuti a seguito della somministrazione di DOXO a 200 nM (sopra) e 450 nM (sotto).

Le stime dei parametri sono riportate in Tabella 4.2.

Osservando l'andamento generale, si riscontra una maggiore omogeneità tra le stime degli stessi parametri per i diversi dosaggi, non mostrando che un parametro sia particolarmente più veloce per un dosaggio piuttosto che per un altro.

In particolare, gli efflussi k_{FE} e k_{BF} sono più veloci con somministrazione di dose inferiore.

Nel caso di somministrazione di 200 nM, si nota che non ci sono significative differenze tra i valori degli stessi parametri stimati con i vari dataset.

La precisione di stima appare soddisfacente in ogni caso, non superando mai un $CV = 40\%$.

Ciò indica che nel caso di stimatore MAP, il meccanismo di soglia di saturazione con controllo di k_{EF} , implementato nel modello con l'equazione di Hill, è adatto a descrivere correttamente il fenomeno osservato.

Il CV percentuale risulta più basso nel caso in cui il dataset sia costruito secondo l'approccio NAD e invece risulta più elevato con approccio NPD costruito sulle medie per campo. Al crescere della disponibilità di dati su cui fittare il modello, cresce anche l'imprecisione della stima, mantenuta comunque affidabile.

Dosaggio DOXO	Approccio	k_{FE} (hr^{-1})	$V_{max_{EF}}$ (hr^{-1})	$K_{max_{EF}}$ (hr^{-1})	k_{BF} (hr^{-1})
200 nM	NAD	$9.7434 \cdot 10^{-4}$ (11.29%)	$2.2759 \cdot 10^5$ (12.54%)	$1.405 \cdot 10^3$ (5.45%)	1.487 (3.41%)
	NPDe	$9.4572 \cdot 10^{-4}$ (14.32%)	$2.5500 \cdot 10^5$ (12.83%)	$1.351 \cdot 10^3$ (6.14%)	1.966 (16.23%)
	NPDe	$9.1488 \cdot 10^{-4}$ (31.19%)	$2.6168 \cdot 10^5$ (12.79%)	$1.335 \cdot 10^3$ (6.34%)	1.954 (36.89%)
450 nM	NAD	$5.3849 \cdot 10^{-4}$ (1.66%)	$1.7414 \cdot 10^5$ (11.82%)	$1.465 \cdot 10^3$ (5.11%)	1.1044 (8.10%)
	NPDe	$8.0013 \cdot 10^{-4}$ (15.93%)	$2.3674 \cdot 10^5$ (13.21%)	$1.388 \cdot 10^3$ (5.81%)	1.301 (10.66%)
	NPDe	$7.2720 \cdot 10^{-4}$ (20.005%)	$2.5467 \cdot 10^5$ (12.98%)	$1.351 \cdot 10^3$ (6.2%)	1.424 (20.96%)

Tabella 4.2: Parametri stimati con stimatore MAP e loro precisione espressa come CV% tra parentesi.

4.3 Confronto predizioni con MAP

In Figura 4.3, si riportano le predizioni della concentrazione intracellulare di DOXO (X_I) e delle sue componenti citoplasmatica (X_F) e nucleare (X_B), nel caso di stima MAP, nel corso delle 8 ore.

In generale, si osserva che X_F cresce molto rapidamente entro la prima mezz'ora di assorbimento, raggiungendo la concentrazione di DOXO nel citoplasma (X_F) massima, che corrisponde alla saturazione, per poi decrescere lentamente fino alla fine della fase di assorbimento. Nella fase di rilascio, forzando la concentrazione nel citoplasma a 0 a $t = 3$ ore, si osserva la quantità di DOXO che si è legata al DNA, cioè quella che sarà effettivamente utile al trattamento antitumorale.

La costante k_{FE} indica la velocità con cui la DOXO entra nella cellula: si osserva che più il valore di questo parametro è alto, più la concentrazione di DOXO in X_F cresce velocemente all'inizio dell'assorbimento. La concentrazione decresce poi tanto più rapidamente tanto quanto $V_{\max EF}$ è maggiore.

Per $D = 200$ nM, con l'utilizzo dei *Dataset 2 e 3*, si osserva che il picco della concentrazione nel compartimento X_F si verifica più in basso e decresce più rapidamente rispetto a quando si utilizza *Dataset 1*: infatti, essi presentano un $V_{\max EF}$ più elevato.

Nel caso di 450 nM, la concentrazione di DOXO nel citoplasma cresce più rapidamente e raggiunge un valore di saturazione più alto nel caso di utilizzo del *Dataset 2*, che presenta infatti il k_{FE} maggiore. La decrescita della concentrazione in X_F dopo la saturazione avviene molto più velocemente per i *Dataset 2 e 3*, mentre per il *Dataset 1*, che presenta un $V_{\max EF}$ minore, la diminuzione avviene più lentamente. Per riassumere, $V_{\max EF}$ più elevato significa che satura più velocemente.

La concentrazione di DOXO nel nucleo invece cresce più lentamente fino alla fine della fase di assorbimento, dopo la quale rimane al valore raggiunto all'inizio del rilascio.

Per entrambe le somministrazioni, la predizione dell'andamento della concentrazione in X_B sui dati del *Dataset 1* cresce più lentamente, in corrispondenza a un valore minore di k_{BF} .

Anche le predizioni del compartimento nucleare sui dati degli altri dataset si comportano rispettando quanto segue: all'aumentare del valore di k_{BF} , aumenta anche la velocità con cui cresce la concentrazione di DOXO nel nucleo.

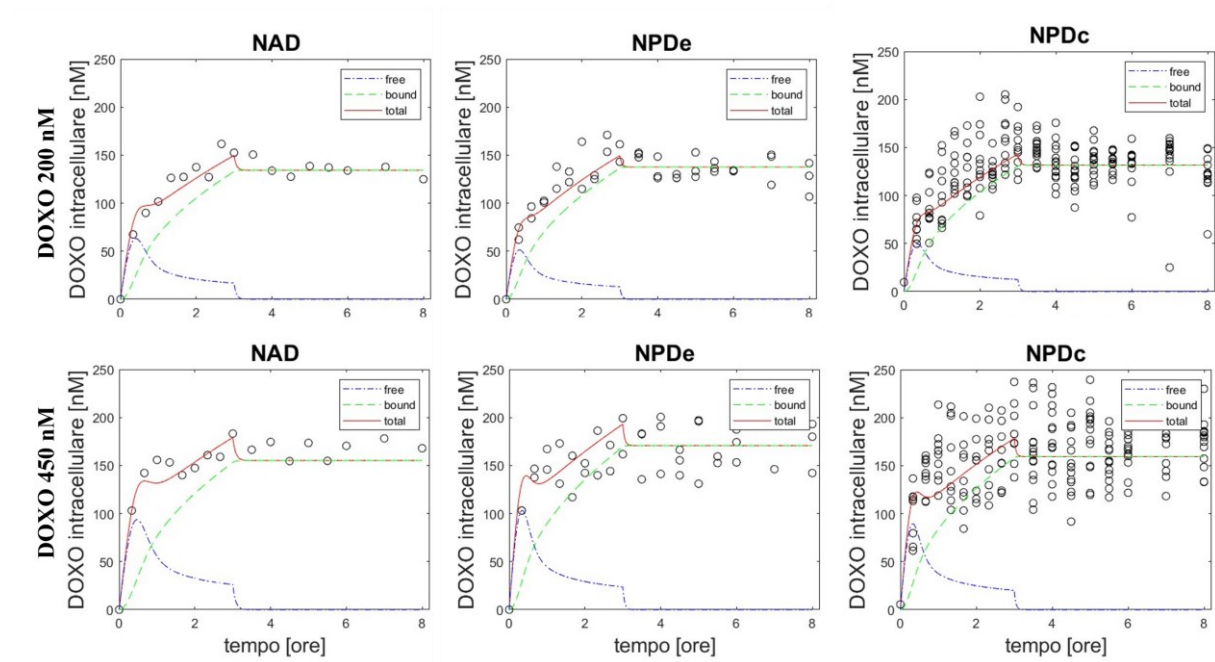


Figura 4.3: Confronto tra dati di concentrazione intracellulare di DOXO (in nero) e predizione del modello di X_I (in rosso), che deriva dalla somma di X_B (in verde) e X_F (in blu) per i dataset NAD (sinistra) NPDe (centro) NPDc (destra) ottenuti a seguito della somministrazione di DOXO a 200 nM (sopra) e 450 nM (sotto).

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

Recentemente è stato proposto un modello PK in grado di descrivere la concentrazione di DOXO in cellule di MM [14]. Esso esprime adeguatamente la resistenza al farmaco delle cellule, per cui la DOXO viene effluita attivamente dalla cellula. Nello specifico, la farmacoresistenza viene espressa applicando un controllo su k_{EF} , formulando un meccanismo di soglia di saturazione definito dall'equazione di Hill, che dipende dalla DOXO legata al DNA, cioè la concentrazione di DOXO nel nucleo.

Una caratteristica particolare di questo studio è che il modello in questione è stato identificato non assumendo alcun errore di misura sui dati, e ipotizzando che il farmaco si distribuisse in modo omogeneo tra le cellule in coltura.

Volendo valutare la possibilità di pesare i dati in base ad una legge di errore, in questa tesi si è sfruttata l'informazione relativa alla standard deviation campionaria. Inoltre, poiché il setup sperimentale non ha permesso il tracking temporale di una stessa cellula, oltre a un più comune approccio Naive Average, si è scelto di valutare la performance del modello anche ricorrendo a tecniche di popolazione. Nello specifico, si è potuto osservare l'andamento temporale delle medie delle concentrazioni intracellulari di DOXO all'interno dello stesso campo di acquisizione e nello stesso esperimento, come descritto per la costruzione dei dataset NPDe e NPDc.

In tutti i casi, si è osservato che l'identificazione con stimatore WLNS non permette una stima robusta dei parametri del modello di Hill. Pertanto, è stato necessario ricorrere a una tecnica di stima basata su stimatore MAP. Tramite l'informazione a priori assunta, è stato possibile

stimare adeguatamente i quattro parametri incogniti del modello proposto nel caso di tutti e tre gli approcci di popolazione.

I risultati hanno evidenziato che l'uso di differenti dataset in riferimento allo stesso dosaggio non porta a sostanziali differenze nella predizione del modello, soprattutto con $D = 200$ nM. In particolare, i valori numerici dei parametri stimati risultano molto simili tra di loro, traducendosi anche in simili profili della predizione del modello dal punto di vista grafico.

Nonostante la grande variabilità dei dati di concentrazione di DOXO osservati, si può affermare che l'approccio NAD riesce ad esprimere bene le dinamiche di popolazione, poiché produce risultati simili a quelli ottenuti con altri approcci.

Questo permette di stabilire che la DOXO si possa considerare uniformemente distribuita tra le cellule, come assunto nel lavoro precedentemente svolto.

È stato possibile tenere conto della notevole dispersione dei dati introducendo l'errore di misura descritto da deviazione standard campionaria. La SD viene calcolata a partire da una popolazione più ampia di dati rispetto a quelli su cui viene applicata, permettendo di considerare la variabilità di essi.

In conclusione, il modello PK proposto per descrivere la farmacocinetica di DOXO in cellule di mieloma multiplo, se accoppiato con un opportuno modello di farmacodinamica, rappresenta uno strumento di supporto nello studiare l'efficacia del farmaco in diversi regimi di dosaggio, e il conseguente effetto nel trattamento della malattia. Possibili sviluppi futuri potrebbero riguardare l'identificazione del modello a partire da dati di altri esperimenti con dosaggi differenti o impiegando ulteriori linee cellulari, come MM1S o MOLP-2.

RIFERIMENTI

- [1] R. Eslick and D. Talaulikar, “Multiple myeloma: From diagnosis to treatment,” *Aust. Fam. Physician*, vol. 42, no. 10, pp. 684–688, 2013.
- [2] L. Rosiñol *et al.*, “Expert review on soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: definition, disease assessment and treatment considerations,” *Br. J. Haematol.*, vol. 194, no. 3, pp. 496–507, 2021, doi: 10.1111/bjh.17338.
- [3] C. Gerecke, S. Fuhrmann, S. Striffler, M. Schmidt-Hieber, H. Einsele, and S. Knop, “Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms,” *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 113, no. 27–28, pp. 470–476, 2016, doi: 10.3238/arztebl.2016.0470.
- [4] J. Sive, K. Cuthill, H. Hunter, M. Kazmi, G. Pratt, and D. Smith, “Guidelines on the diagnosis, investigation and initial treatment of myeloma: a British Society for Haematology/UK Myeloma Forum Guideline,” *Br. J. Haematol.*, vol. 193, no. 2, pp. 245–268, 2021, doi: 10.1111/bjh.17410.
- [5] H. N. Abramson, “The Multiple Myeloma Drug Pipeline—2018: A Review of Small Molecules and Their Therapeutic Targets,” *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.*, vol. 18, no. 9, pp. 611–627, 2018, doi: 10.1016/j.clml.2018.06.015.
- [6] P. S. Becker *et al.*, “A phase 2 study of bortezomib, cyclophosphamide, pegylated liposomal doxorubicin and dexamethasone for newly diagnosed multiple myeloma,” *Blood Cancer J.*, vol. 6, no. 5, pp. 6–8, 2016, doi: 10.1038/BCJ.2016.31.
- [7] A. G. Mittenberg *et al.*, “Combined treatment of human multiple myeloma cells with bortezomib and doxorubicin alters the interactome of 20S proteasomes,” *Cell Cycle*, vol. 17, no. 14, pp. 1745–1756, 2018, doi: 10.1080/15384101.2018.1496742.
- [8] H. Taymaz-Nikerel, M. E. Karabekmez, S. Eraslan, and B. Kırdar, “Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-31939-9.
- [9] S. Rivankar, “An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy,” *J. Cancer Res. Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 853–858, 2014, doi: 10.4103/0973-1482.139267.
- [10] C. F. Thorn *et al.*, “Doxorubicin pathways,” *Pharmacogenet. Genomics*, vol. 21, no. 7, pp. 440–446, 2011, doi: 10.1097/fpc.0b013e32833ffb56.
- [11] M. T. McKenna *et al.*, “A Predictive Mathematical Modeling Approach for the Study of Doxorubicin Treatment in Triple Negative Breast Cancer,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp.

- 1–14, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05902-z.
- [12] C. Petterino *et al.*, “Della Resistenza Multipla Ai Farmaci,” pp. 33–39, 2003.
- [13] J. Cox and S. Weinman, “Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma,” *Hepatic Oncol.*, vol. 3, no. 1, pp. 57–59, 2016, doi: 10.2217/hep.15.41.
- [14] A. Giaretta, F. Da Ros, M. Mazzucato, M. G. Pedersen, and R. Visentin, “Modeling Pharmacokinetics of Doxorubicin in Multiple Myeloma Cells,” *Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. EMBS*, pp. 4374–4378, 2021, doi: 10.1109/EMBC46164.2021.9629493.
- [15] C. Christowitz, T. Davis, A. Isaacs, G. Van Niekerk, S. Hattingh, and A. M. Engelbrecht, “Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model,” *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1186/s12885-019-5939-z.
- [16] J. G. Turner *et al.*, “Treatment of acquired drug resistance in multiple myeloma by combination therapy with XPO1 and topoisomerase II inhibitors,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1186/s13045-016-0304-z.
- [17] S. Conditions and I. Use, “Storage Conditions ;,” no. 11686, p. 11686, 2003.
- [18] K. K. Karukstis, E. H. Z. Thompson, J. A. Whiles, and R. J. Rosenfeld, “Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin,” *Biophys. Chem.*, vol. 73, no. 3, pp. 249–263, 1998, doi: 10.1016/S0301-4622(98)00150-1.
- [19] S. Goutelle *et al.*, “The Hill equation: A review of its capabilities in pharmacological modelling,” *Fundam. Clin. Pharmacol.*, vol. 22, no. 6, pp. 633–648, 2008, doi: 10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x.
- [20] A. J. Stolarz *et al.*, “Doxorubicin activates ryanodine receptors in rat lymphatic muscle cells to attenuate rhythmic contractions and lymph flow,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 371, no. 2, pp. 278–289, 2019, doi: 10.1124/jpet.119.257592.