

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук (ФИАН)

Научно-квалификационная работа (диссертация)

**ВРЕМЕННОЕ ОБЛЕГЧЕНИЕ
ВНУТРИОПУХОЛЕВОЙ ГИПОКСИИ
В ПЕРВЫЕ ДНИ АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ
КАК РЕЗУЛЬТАТ ВЫЗВАННЫХ ТЕРАПИЕЙ ИЗМЕНЕНИЙ
В ПРИТОКЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ
И МЕТАБОЛИЗМЕ ОПУХОЛЕЙ –
АНАЛИЗ МЕТОДОМ
МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Аспирант Кузнецов Максим Борисович

Научный руководитель Колобов Андрей Владимирович, к. ф.-м. н.

«Допустить к защите»

«__» _____ г.

Москва

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
1. Модель.....	7
1.1 Опухоль и нормальная ткань.....	9
1.2 Микроциркуляторная сеть.....	10
1.3 Питательные вещества.....	12
1.3.1 Приток в ткань.....	12
1.3.2 Потребление клетками.....	14
1.4 VEGF и антиангиогенная терапия.....	18
1.5 Параметры модели.....	19
1.6 Численное решение.....	24
2. Результаты.....	26
2.1 Модельная симуляция при базовом наборе параметров.....	26
2.2 Влияние параметров на динамику кислорода внутри опухоли.....	32
Заключение.....	42
Список литературы.....	45
Приложение А Вывод уравнения для поля конвективной скорости	54
Приложение Б Оценка проницаемостей	55

Введение

Рост злокачественной опухоли неизбежно сопровождается перестройкой микроциркуляторной сети. С самого начала роста опухоли кровеносные капилляры отталкиваются активно пролиферирующей опухолевой массой и разрушаются внутри нее из-за повышенного механического давления и различных химических факторов, среди которых повышенная кислотность и изменения в экспрессии ангиопоэтинов [1,2]. Это разрушение наряду с неспособностью микроциркуляторной системы удовлетворить повышенные метаболические потребности неопластических клеток ограничивают скорость роста опухоли и в конечном итоге приводят к метаболическому стрессу в ядре опухоли и последующему образованию некроза в нем. Опухолевые клетки реагируют на нехватку питательных веществ стимулированием ангиогенеза, т.е., формирования новых кровеносных сосудов, что широко признано одним из основных признаков злокачественных опухолей [3]. В здоровом организме процесс ангиогенеза имеет место, например, во время заживления ран и эмбрионального развития, и он тонко организован сбалансированным действием про- и антиангиогенных факторов, что приводит к точно настроенной и хорошо функционирующей сосудистой системе. Однако непрекращающаяся чрезмерная выработка проангиогенных факторов опухолью приводит к образованию хаотической микроциркуляторной сети, капилляры которой характеризуются аномальной морфологией эндотелиальных клеток, отсутствием поддерживающих перицитов и вытекающими из этого изменениями в форме и функциональности – эти капилляры расширены, извилисты и гораздо более проницаемы для плазмы крови растворенных в ней веществ, чем обычные сплошные капилляры, которые являются преобладающим типом микрососудов тела [4,5].

Большинство клинически одобренных антиангиогенных препаратов направлены на блокирование действия фактора роста эндотелия сосудов, VEGF, который является основным опухолевым ангиогенным фактором, стимули-

рующим пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, а также ветвление сосудов [6]. Такая терапия в конечном итоге приводит к ограничению поступления питательных веществ к опухоли, поскольку она прекращает образование новых капилляров, в то время как существующие продолжают деградировать с ростом опухоли. Кроме того, действие VEGF на эндотелиальные клетки приводит к аномальной морфологии микрососудов, в том числе к их повышенной проницаемости [7]. Следует отметить, что обычные микрососуды также демонстрируют быстрое увеличение проницаемости в присутствии VEGF [8]. Анти-VEGF терапия нормализует структуры одиночных капилляров, при этом временно приводя микроциркуляторную сеть опухоли в более физиологически нормальное состояние, что было показано в многочисленных экспериментах [9,10].

Интересная особенность антиангиогенной терапии (ААТ), обнаруженная в экспериментах на некоторых мышинных моделях опухолей, заключается в том, что она может приводить к временному повышению уровня кислорода внутри опухоли [11,12]. В соответствующих работах это явление объясняется тем, что нормализация структуры микрососудов, вызванная действием антиангиогенного препарата, приводит к улучшению кровотока в опухолях в первые дни антиангиогенного лечения, из-за чего приток кислорода к опухоли временно повышается [13].

При постоянном градиенте давления, на который ААТ не влияет напрямую, кровоток обратно пропорционален сопротивлению капиллярной системы, и, следовательно, улучшение кровотока должно быть прямым следствием падения общего сопротивления микрососудистой сети. Однако нейтрализация VEGF приводит в действие множество физиологических процессов, каждый из которых сам по себе оказывает на него различное влияние. Некоторые из процессов должны приводить к снижению сопротивления капилляров, наиболее важным из которых является, по-видимому, снижение интерстициального давления, которого как правило увеличено в опухолях из-за увеличенной проницаемости сосудов для плазмы крови и из-за деградированной лимфатической

системы [14]. Напротив, уменьшение диаметров капилляров из-за их нормализации должно приводить к увеличению геометрического сопротивления капилляров, а деградация капилляров в конечном итоге приводит к увеличению общего сопротивления. Сужение капилляров должно также приводить к снижению гематокрита, то есть к уменьшению содержания кровяных клеток в капиллярной крови, что, в свою очередь, должно приводить к снижению вязкого сопротивления, но также и к уменьшению концентрации кислорода в капиллярах, поскольку он переносится эритроцитами.

Именно сложное взаимодействие всех этих факторов определяет изменение итогового сопротивления капиллярной системы опухоли и влияет на приток кислорода в опухоль. Поэтому разумно предположить, что результат этого взаимодействия будет различаться в каждом конкретном случае и будет зависеть от факторов, специфичных для конкретной опухоли, конкретного пациента и конкретного органа. Эта идея подтверждается результатами экспериментов на мышинных моделях опухолей, которые, в отличие от вышеупомянутых, демонстрируют снижение перфузии опухолей в начале ААТ [16,17]. Более того, недавние клинические испытания показывают, что изменения в перфузии и оксигенации опухолей могут значительно варьироваться даже в пределах одной выборки пациентов, указывая на то, что эти эффекты сильно зависят от случая к случаю [18,19].

С другой стороны, концентрация кислорода в опухолевой ткани также зависит от скорости потребления кислорода (СПК) опухолевыми клетками, и его снижение также приведет к уменьшению гипоксии. Этот факт не принимается во внимание в большинстве исследований по этой теме, хотя хорошо известно, что ААТ приводит к изменениям опухолевого метаболизма [20]. Особый интерес представляет тот факт, что приток двух основных питательных веществ, кислорода и глюкозы, изменяется по-разному в процессе нормализации микрососудов. Трансваскулярный перенос обеих этих малых молекул регулируется процессом диффузии, но кислород способен диффундировать непосредственно через стенку капилляра, поэтому его транспортировка остается практически

неизменной, а диффузия глюкозы (как и абсолютного большинства других питательных веществ) сильно зависит от количества и размеров пор [21], поэтому его приток значительно уменьшается вследствие нормализации структуры капилляров, что, в свою очередь, ограничивает пролиферацию опухолевых клеток, поскольку этот процесс зависит от глюкозы как от основного энергетического питательного вещества и основного субстрата для биосинтеза. Это хорошо иллюстрируется тем фактом, что чрезмерная экспрессия ангиопоэтина-1, приводящего к увеличению статуса созревания сосудов без значительных изменений в плотности сосудов и экспрессии VEGF, ведет к значительному замедлению роста опухоли [22].

Такие рассуждения приводят к вопросу о том, является ли увеличение кровотока единственной причиной облегчения гипоксии в ходе антиангиогенного лечения. Далее мы исследуем эту задачу с помощью математического моделирования с учетом ключевых особенностей метаболизма опухоли и притока веществ в ткань, пренебрегая изменением кровотока в отдельных капиллярах. Эта задача представляет собой значительный практический интерес, поскольку временное облегчение гипоксии создает основу для оптимизации комбинированной антиангиогенной и лучевой терапии, так как эффективность последней напрямую зависит от концентрации кислорода в опухоли.

Математическое моделирование роста и терапии опухоли с учетом ангиогенеза сопряжено с определенными трудностями. Поскольку рост опухоли – это невероятно сложный процесс, необходимо тщательно выбрать, какие его свойства следует рассматривать в модели, и как именно их следует описывать математически, чтобы объективно захватить все необходимые детали и одновременно с этим не переусложнить модель. При этом главной проблемой является необходимость учитывать объекты и процессы на разных шкалах размеров. Действительно, типичный диаметр капилляра составляет 5-10 мкм, типичный размер клетки 10-30 мкм, типичное расстояние между капиллярами 100-200 мкм, средняя длина капилляра составляет 0,5-1 мм, а размер опухоли-

может достигать нескольких сантиметров, что приводит к разнице в масштабах более трех порядков величины.

Существует несколько распространенных типов опухолевых моделей. Первый тип – это нераспределенные модели, которые представляют собой набор обыкновенных дифференциальных уравнений с феноменологическими зависимостями [23,24], что делает их относительно простыми, но также сильно ограничивает их применимость. Более сложный подход использует клеточные автоматы или другие виды агентного моделирования, для учета отдельных опухолевых клеток и сосудов, при этом динамика веществ обычно описывается через уравнения реакции-диффузии [25,26]. Эти модели способны произвести замечательный иллюстративный результат, но требуют больших вычислительных ресурсов, поэтому симуляции с ними обычно выполняются в небольших областях, и воспроизводится только начальная стадия роста опухоли. Это препятствие преодолевается в моделях, управляемых системой уравнений с частными производными, в которой не только вещества, но также опухолевые клетки и микроциркуляторная сеть моделируются через пространственно распределенные переменные [27,28,29]. Этот подход связан с определенными проблемами, касающимися адекватного описания микроциркуляторной сети, однако он позволяет учитывать рост больших новообразований при относительно низких затратах на вычисления. Представленная здесь модель имеет тип реакции-диффузия-конвекция и разработана на основе наших предыдущих работ в этой области [30,31]. Ее основной отличительной особенностью является одновременный учет двух основных питательных веществ, то есть глюкозы и кислорода, с подробным рассмотрением их притока и потребления, что имеет решающее значение для исследования рассматриваемого явления.

1. Модель

На рисунке 1 продемонстрирована блок-схема основных связей между переменными модели. Каждая переменная является функцией координат пространства r и времени t , которые опущены для простоты представления. Модельные взаимодействия выражены в математической форме в следующих разделах.

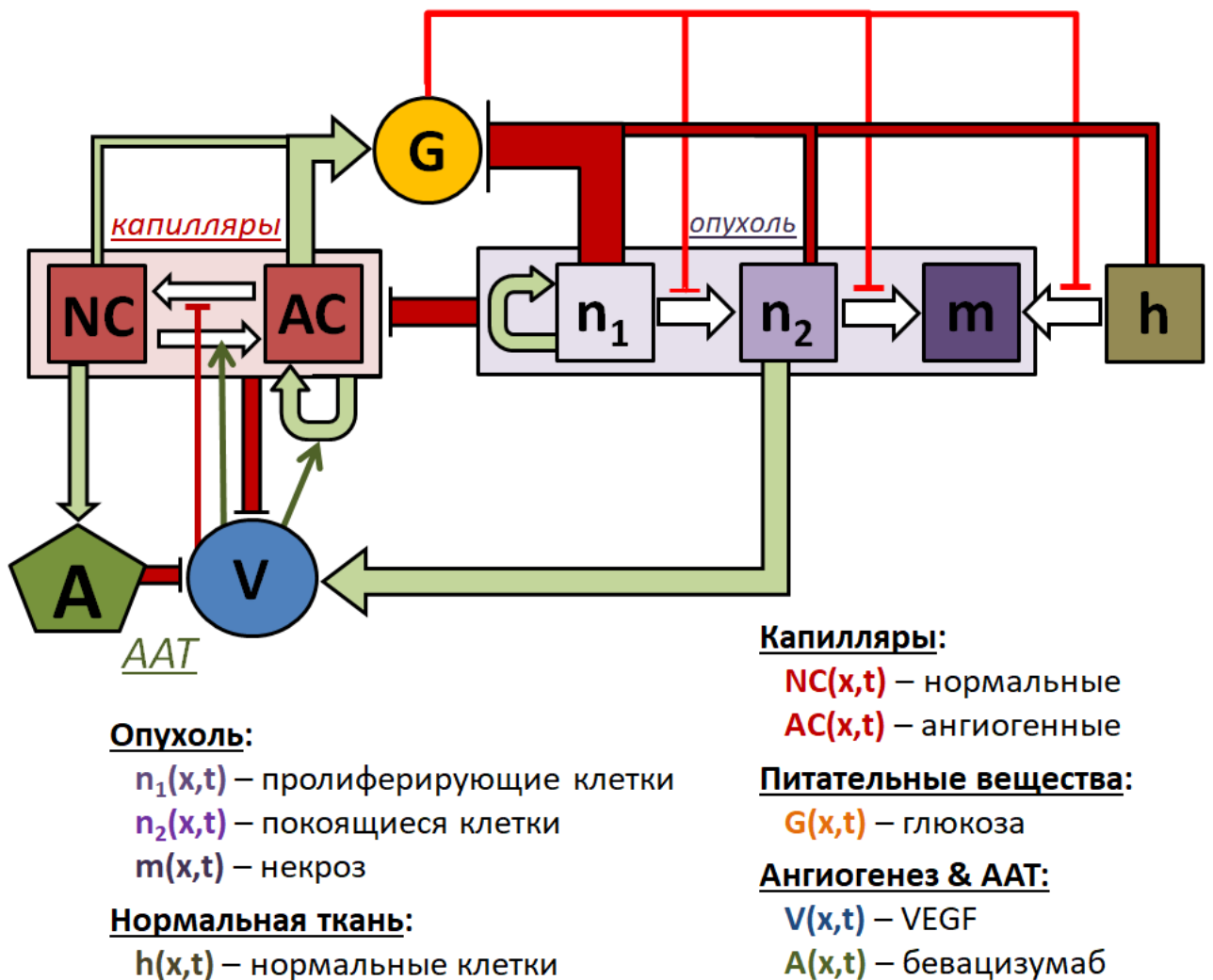


Рисунок 1. Блок-схема модели роста опухоли и антиангиогенной терапии. Белые стрелки обозначают переходы между переменными, зеленые стрелки отмечают стимулирующие влияния, увеличивающие плотность соответствующей переменной или интенсивность соответствующего перехода, красные линии указывают на ингибирующие взаимодействия.

1.1 Опухоль и нормальная ткань

В этой модели опухоль растет в несжимаемой плотной ткани, что означает, что сумма всех компонентов ткани является постоянной и для удобства нормализована на единицу. Мы рассматриваем моноклональную опухоль, представляющую собой гетерогенную популяцию, состоящую из активно пролиферирующих клеток, нормализованная плотность которых n_1 , и покоящихся (в том смысле, что они не движутся по клеточному циклу) клеток с плотностью n_2 . Переход клеток из пролиферирующего состояния в покой зависит от локальной концентрации глюкозы G , которая является основным питательным веществом для пролиферации клеток [32] и поэтому выбрана в качестве ключевого питательного вещества. Ткань первоначально состоит из нормальных клеток тела, локальная фракция которых h . Нормальные клетки и покоящиеся опухолевые клетки могут гибнуть, переходя в некроз, доля которого в ткани равна m . Фактор, определяющий выживание клеток – концентрация кислорода O_2 , причины такого подхода будут объяснены в параграфе 1.3. Локальная кинетика отдельных компонентов ткани влияет на распределение других переменных во всей ткани – например, клетки опухоли, пролиферируя, расталкивают окружающие ткани, обеспечивая увеличение размера опухоли. Конвективная скорость \mathbf{v} введена для учета таких эффектов. Кроме того, опухолевые клетки обладают собственной подвижностью и способны мигрировать по ткани.

Уравнения, описывающие динамику опухолевых и нормальных клеток, выглядят следующим образом:

$$\partial n_1 / \partial t = \lambda n_1 - P_1(G) n_1 - (1 - n_1) \mathbf{v} \cdot \nabla n_1 - d_1 n_1$$
$$\partial n_2 / \partial t = P_1(G) n_1 - (1 - n_2) \mathbf{v} \cdot \nabla n_2 - d_2 n_2$$

Зависимость скорости перехода клеток из пролиферирующего в покоящееся состояния $P_1(G)$ была оценена в экспериментальном исследовании [33]. Обратный переход не учитывается в этой модели, поскольку он будет играть роль только в том случае, если покоящиеся клетки достигают регионов с достаточным уровнем глюкозы для пролиферации, чего не происходит во время моделирования. Вывод градиента конвективной скорости аналогичен представленному в [34] и приведен в Приложении А, при этом объемы всех клеток, как и объем некроза, образующегося в результате их гибели, считаются равными. Мы пренебрегаем диффузией пролиферирующих клеток, поскольку известно, что активно пролиферирующие опухолевые клетки мигрируют значительно медленнее, чем покоящиеся [35].

1.2 Микроциркуляторная сеть

Как было отмечено выше, в модели используются две переменные для описания микроциркуляторной сети, а именно ее нормальной и аномальной части, NC и AC , которые вводятся для учета физиологических различий капилляров, в частности, различий в их проницаемости. Локальное отношение значений этих переменных можно рассматривать как характеристику, которая определяет эффективную локальную проницаемость и влияет на результирующий приток веществ. Следует отметить, что метод описания сети взаимосвязанных микрососудов через пространственно распределенные переменные является довольно грубым, но неизбежным упрощением при работе с реакционно-диффузионными системами. Тем не менее, такое описание передает суть процессов, составляющих динамику микрососудов, которые уже упоминались во введении, что достаточно для рассматриваемых здесь задач. Внутри опухоли, включая некроз, происходит деградация капилляров, при этом мы используем простейшую возможную форму для скорости деградации, предполагая, что она пропорциональна общей плотности опухоли. Капилляры движутся вместе с конвективными потоками, но скорость их движения предполагается более низ-

кой, чем у клеток, благодаря их связности друг с другом. При этом сама динамика капилляров не влияет на значение конвективной скорости, так как их объем считается пренебрежимо малым. Действие VEGF, V , на капилляры приводит к ангиогенезу, описываемому образованием аномальных капилляров AC из обоих типов существующих капилляров, а также к «денормализации» капилляров, выраженной при переходе из NC в AC , который используется в модели, чтобы описать стимуляцию увеличения проницаемости сосудов фактором роста эндотелия сосудов. Оба действия моделируются с помощью широко используемой в биохимии формулы Михаэлиса-Ментен, благодаря которой скорости соответствующих процессов равны нулю при отсутствии VEGF и приближаются к максимальным значениям при достаточной его концентрации. Общая плотность капиллярной сети ограничена сверху. При низкой концентрации VEGF структура капилляров нормализуется, что выражается обратным переходом из AC в NC . Член поддержания плотности микроциркуляторной сети введен для отражения ее тенденции к возврату к постоянной физиологически обоснованной плотности при ее превышении, в связи с чем в соответствующем члене используется ступенчатая функция Хевисайда. Этот член играет роль, когда опухолевый ангиогенез прекращается вследствие терапевтического вмешательства и необходим для имитации нормализации плотности микрососудов в процессе лечения. Вышесказанное отражено в следующих уравнениях:

(2)

1.3 Питательные вещества

Модельная динамика обоих питательных веществ – глюкозы G и кислорода O_2 – включает в себя одни и те же процессы: приток в ткань из капиллярной сети, потребление опухолью и нормальными клетками и диффузию внутри ткани. Однако динамика кислорода значительно отличается от динамики глюкозы ввиду особенностей его транспорта в крови, транскапиллярного транспорта и метаболизма опухолей.

1.3.1 Приток в ткань

Как уже отмечалось, перенос глюкозы через стенку капилляров зависит от количества и размеров пор в них, поэтому его приток из ангиогенных капилляров больше, чем из сплошных капилляров организма, что вместе с увеличением количества капилляров приводит к усиленному снабжению опухоли этим важнейшим питательным веществом. Приток глюкозы достаточно мал для того, чтобы его концентрация падала незначительно на протяжении длины капилляра. Непосредственные измерения показывают небольшую артериально-венозную разницу в концентрации глюкозы даже в опухолях (см., например, [36]), в связи с чем концентрация глюкозы в крови в модели принимается постоянной.

Напротив, поскольку кислород проникает непосредственно через стенки капилляров, проницаемость для него (которая на четыре порядка больше, чем для глюкозы) может считаться равной для обоих типов модельных капилляров. Уровни кислорода в артериальной и венозной крови даже при нормальных условиях отличаются более чем в два раза [37], из чего следует, что его концен-

трацию в крови нельзя рассматривать как постоянную, а его приток в ткань в первом приближении пропорционален потоку крови через опухолевую микроциркуляторную сеть, а не ее капиллярной поверхности. Для учета величины кровотока в модели используется функция $Q_{O_2,ic}$, которая обозначает зависимость кровотока от плотности поверхности микроциркуляторной сети, и была получена в результате исследования отдельной модели капиллярной сети [38]. Более того, приток кислорода в ткань не является линейно пропорциональным разнице его концентраций в капиллярной крови и ткани, как в случае глюкозы, ввиду сложного механизма переноса кислорода в крови, молекулы которого переносятся в двух формах – как часть оксигемоглобина, т.е. обратимо связанными с молекулами гемоглобина в эритроцитах, и в свободной форме, растворенными в плазме крови и эритроцитах. Термин «концентрация кислорода» сам по себе не используется в клиниках, поскольку это не является непосредственно измеряемой величиной. Гораздо более популярным параметром является давление кислорода, которое пропорционально концентрации свободного кислорода и, следовательно, является величиной, разницей которой в крови и ткани находится в прямом соотношении с притоком кислорода [39]. Однако большая часть кислорода в крови (примерно 98% в физиологическом диапазоне состояний) связана с гемоглобином, причем доля оксигемоглобина является функцией давления кислорода, которая называется кривой диссоциации кислорода и гемоглобина. Форма этой функции и ее зависимость от внешних параметров были хорошо известны уже столетие назад [40]. В свете вышесказанного, член притока крови в настоящей работе выведен на основании двух ключевых предположений: 1) транскапиллярный перенос кислорода достаточно быстрый, чтобы значения давления кислорода в капилляре и в ткани становились равными за время протекания кислорода по капилляру; 2) количество свободного кислорода в крови незначительно по сравнению с кислородом в связанном с гемоглобином состоянии. Вместе с более общим модельным предположением о том, что объем капиллярной сети пренебрежимо мал по сравнению с объемом ткани, этот приводит к тому, что модельный приток кислорода пропорционален

разнице между значениями насыщения гемоглобина при двух значениях концентрации свободного кислорода – в артериальной крови, которая втекает в капилляры, и в ткани.

1.3.2 Потребление клетками

Одним из основных признаков злокачественных опухолей является перепрограммированный клеточный метаболизм, который, в отличие от другого признака, которому в данной работе уделено большое внимание, то есть индукции ангиогенеза, получил широкое признание только в последнее десятилетие [41]. Основным и наиболее эффективным метаболическим путем для нормальной клетки для получения энергии является окислительное фосфорилирование (ОКФОС) различных питательных веществ с использованием кислорода. Преобразование одного моля глюкозы в углекислый газ и воду через ОКФОС обеспечивает клетки до 36 молями АТФ, который затем используется ими в качестве источника энергии. При недостаточной концентрации кислорода клеткам приходится полагаться на менее эффективные метаболические пути, такие как анаэробный гликолиз [42], который дает только около 2 моль АТФ на один потребленный моль глюкозы, но в целом способен обеспечить более высокую скорость генерации АТФ при достаточном уровне глюкозы из-за того факта, что анаэробный гликолиз происходит во всем объеме цитоплазмы клетки, тогда как ОКФОС ограничен определенными органеллами, а именно митохондриями. Однако относительная роль гликолиза как генерирующего энергию метаболического пути значительно возрастает в злокачественных клетках, даже при высокой концентрации кислорода. Это явление известно как «эффект Варбурга» [43]. В настоящее время споры о его причинах не прекращаются, и было предложено несколько возможных объяснений ему, среди которых: дефекты в митохондриях (предложение, сделанное самим Варбургом), адаптация к гипоксическому микроокружению [44] и прямая модуляция функции митохондрий генами малигнизированных клеток с целью минимизации образования

активных форм кислорода, побочных продуктов митохондриального дыхания, которые участвуют в клеточном апоптозе [45]. В данной работе мы полагаемся на гипотезу о том, что основной причиной эффекта Варбурга является функциональная перестройка метаболизма злокачественных клеток с целью максимизации скорости пролиферации опухоли, поскольку само использование аэробного гликолиза облегчает производство биомассы и позволяет усилить участие митохондрий в биосинтезе [32,46]. Таким образом, клетки, которые активно используют аэробный гликолиз, имеют определенное эволюционное преимущество перед другими клетками. Многие экспериментальные факты подтверждают эту гипотезу явным или неявным образом. Во-первых, такое же гликолитическое переключение наблюдается в нормальных пролиферирующих тканях и одноклеточных организмах. Во-вторых, эффект Варбурга проявляется и в линиях опухолевых клеток, для которых известно, что их митохондрии функционируют нормально [47], а также в опухолях, растущих в избытке кислорода, например, в опухолях легких и крови [48,49]. Определенные экспериментальные данные, полученные на молекулярном уровне, также хорошо согласуются с вышеупомянутой гипотезой: например, известно, что онкогены, такие как c-Myc и HIF-1 α , одновременно усиливают производство как гликолитических, так и биосинтетических ферментов [50], также была неоднократно показана значительная корреляция между экспрессией критического фермента аэробного гликолиза, лактатдегидрогеназы, и пролиферативной активностью различных опухолевых клеток [47,51].

Важным моментом касательно эффекта Варбурга является то, что повышенная роль гликолиза в выработке энергии пролиферирующими опухолевыми клетками вовсе не означает, что они потребляют кислород медленнее, чем покоящиеся клетки. Из-за значительно повышенных энергетических потребностей пролиферирующих опухолевых клеток их СПК и, следовательно, скорость производства энергии за счет ОКФОС, тем не менее, по крайней мере часто,

значительно выше, чем в покое, что подтверждается прямыми экспериментальными измерениями [52].

Подробное адекватное моделирование клеточного метаболизма является едва ли выполнимой задачей, поскольку формирование новых клеток требует выполнения колоссального количества сложных гибко настроенных процессов. Тем не менее, возможно грубо отразить в модели основные черты опухолевого метаболизма. В этой версии модели потребление кислорода, как и потребление глюкозы, описывается традиционным способом, то есть с помощью уравнений типа Михаэлиса-Ментен. Пролиферирующие опухолевые клетки полагаются главным образом на аэробный гликолиз, и обладают высокой скоростью утилизации глюкозы по сравнению с таковой для покоящихся опухолевых клеток и нормальных клеток. При значительном снижении концентрации глюкозы пролиферирующие опухолевые клетки переходят в покоящееся состояние, в котором они испытывают метаболический стресс и полагаются главным образом на ОКФОС при производстве АТФ.

При нехватке питательных веществ злокачественные клетки могут разрушать свои собственные органеллы через процесс аутофагии и с помощью ОКФОС использовать их в качестве источника энергии [53]. Ввиду этого наличие кислорода считается в модели решающим фактором выживаемости покоящихся клеток, что отражено в уравнениях (1). В формуле для СПК покоящихся клеток два слагаемых: первый описывает окисление глюкозы и проявляется при ее достаточных концентрациях; второй соответствует аутофагии и играет роль при низких уровнях глюкозы. Разумеется, глюкоза не является единственным субстратом, окисляемым в опухолевых клетках: многие опухоли также сильно зависят от глутаминолиза, т.е. катаболизма глутамина [50]; кроме того, они могут использовать лактат, произведенный другими клетками в процессе аэробного гликолиза, в качестве топлива для собственного процесса ОКФОС [54]; также существуют другие окислительные пути, индивидуальные для каждой конкретной линии опухолевых клеток [55]. Ради простоты мы не рассматриваем явно эти особенности метаболизма опухолей.

Известно, что при уменьшении концентрации глюкозы относительная роль ОКФОС в опухолевых клетках может увеличиваться вместе с их СПК [56] (эффект не рассмотрен в модели). Однако такое поведение, оправданное для активно пролиферирующих клеток, вряд ли можно ожидать для клеток, находящихся в метаболическом стрессе, которые замедляют свой метаболизм и даже полагаются на аутофагию. Поэтому опухолевые клетки скорее продемонстрируют снижение СПК при дальнейшем ослаблении притока питательных веществ, что обеспечит им преимущество в выживании. Прямые экспериментальные измерения этого эффекта, насколько нам известно, не опубликованы, однако аналогичный эффект был продемонстрирован в многочисленных экспериментах, например, на бактериях [57]. Таким образом, мы предполагаем, что СПК покоящихся клеток падает при нехватке питательных веществ, что и выражается через второй член соответствующего уравнения. Мы не рассматриваем метаболизм нормальных клеток в деталях, а также игнорируем аналогичную особенность в уравнении для нормальных клеток, которые, как известно, хуже переносят нехватку питательных веществ [58], более того, было проверено, что включение этого эффекта для них в модель не влияет на результаты.

Все приведенные предположения для динамики питательных веществ представляются в математическом виде следующим образом:

$$(3) \quad \frac{\partial G}{\partial t} = \overbrace{[P_{G,PC}PC + P_{G,AC}AC]}^{\text{приток}} (G_{D1} - G) \ominus \overbrace{\frac{[q_{G,n1}n_1 + q_{G,n2}n_2 + q_{G,h}h]G}{c + c^*}}^{\text{потребление}} \overset{\text{диффузия в}}{+ D_G \Delta} G$$

1.4 VEGFu ангиогенная терапия

Единственным стимулятором ангиогенеза, включенным в модель, является фактор роста эндотелия сосудов VEGF, V , который производится покоящимися опухолевыми клетками, находящимися в условиях метаболического стресса. В модели не рассматривается детально сложная система взаимодейст-

вий VEGF с рецепторами эндотелиальных клеток, а также связывание VEGF с тканевыми элементами, несмотря на то, что эти процессы хорошо изучены и соответствующие модели встречаются в литературе [60]. Вместо этого в модели используется простейшая форма члена для описания интернализации VEGF рецепторами эндотелиальных клеток, и это упрощение оправдывается тем фактом, что изменение модели динамики VEGF в разумных пределах практически не влияет на полученные результаты. Также учитывается диффузия VEGF в ткани, его деградация и отток из ткани, что является причиной его повышенной концентрации в крови у онкологических больных [61]. Отток VEGF включен в модель в явном виде в предположении, что его концентрация в крови незначительна по сравнению с его уровнем в ткани.

Для рассмотрения антиангиогенной терапии мы моделируем действие и динамику бевацизумаба. Он вводится внутривенно, что описывается обыкновенным дифференциальным уравнением для его концентрации в крови, состоящим из члена введения, из-за которого концентрация бевацизумаба в крови резко увеличивается в момент его инъекции, а также и члена его выведения из крови. Бевацизумаб поступает из крови в ткань, где он диффундирует и необратимо связывается с VEGF, переводя его в неактивное состояние. В члене притока препарата в ткань, как и в случае с глюкозой и VEGF, учтена разница между проницаемостями различных капилляров для бевацизумаба, причем это соотношение значительно больше, чем для других веществ из-за больших размеров его молекул. Поскольку бевацизумаб является макромолекулой, разработанной специально для ингибирования VEGF, он практически не взаимодействует с элементами ткани.

$$\frac{dV}{dt} = \gamma(V_2) - \omega V(PC + AC) - [P_1(V, PC)PC + P_2(V, AC)AC] - d_1 V - (k_1 A_1 V) - \dots$$

(4)

1.5 Параметры модели

Модель содержит несколько десятков параметров, которые взяты из различных экспериментов разной природы, где это возможно, или оцениваются по порядку величины с целью воспроизведения известных свойств роста опухоли. Базовый набор параметров представлен в таблице 1, где используются следующие параметры нормализации для получения их модельных значений: $t_n = 1$ час для времени, $L_n = 10^{-2}$ см для длины, $S_n = O_{2,n} = 1$ мМ для концентрации глюкозы и кислорода. Параметры нормализации для VEGF и бевацизумаба используются в уравнениях, описывающих ААТ и выбраны равными $V_n = 10^{-11}$ моль/мл и $A_n = 1,6 \cdot 10^{-9}$ моль/мл, при этом последнее значение оценивается как средняя концентрация бевацизумаба в крови человека после введения дозы 15 мг/кг. Максимальная плотность опухолевых клеток равна $3 \cdot 10^8$ клеток/мл и взята из [56], откуда также взяты скорости потребления питательных веществ опухолевыми клетками. Нормальная плотность поверхности капиллярной сети принимается равной $PC_n = 100$ см²/см³ и основана на усредненном значении для мышцы человека [21].

В оценках скоростей пролиферации и скорости потребления питательных веществ злокачественными клетками мы полагаемся на соответствующие значения, полученные на начальном этапе роста многоклеточных опухолевых сфероидов ЕМТ6/Ro в суспензии, но мы предполагаем, что эти значения должны быть пропорционально уменьшены во время роста соответствующей опухоли в ткани из-за таких факторов, как механическое давление, повышенная кислотность и лактат, вырабатываемые клетками опухоли [72]. Оценка скорости потребления глюкозы покоящимися опухолевыми клетками основана на наблюдении, сделанном в [33], что она должна быть как минимум в 40 раз ниже, чем скорость потребления глюкозы пролиферирующими клетками той же опухолевой линии. Скорость потребления кислорода покоящимися клетками опухоли в шесть раз выше, чем глюкозы, поскольку эти вещества используются клетками для окисления глюкозы именно в этой пропорции. Доля СПК покоящихся опухолевых клеток в отсутствие глюкозы должна быть меньше единицы, как было

объяснено в параграфе 1.3.2, влияние его вариации исследовано в параграфе 1.2. Значения скоростей потребления питательных веществ нормальными клетками основаны на соответствующих значениях для покоящейся человеческой мышцы. Значения максимальных скоростей гибели нормальных и опухолевых клеток оценены по экспериментальным данным по поведению клеток при острой нехватке питательных веществ, при этом параметры чувствительности к

Параметр	Описание	Значение	Значение в модели	Источник
Опухолевые клетки:				
B	скорость пролиферации	0,03	0,03	[56]+ см. текст
k_1	максимальная скорость перехода в состояние покоя	0,4	0,4	[33]
k_2	чувствительность к переходу в состояние покоя к глюкозе	19,8 $\left(\frac{\text{мМ}}{\text{мМ}}\right)^{-1}$	3,6	[33]
d_{max}	максимальная скорость гибели	0,02	0,02	[58]+ см. текст
k_{O_2}	чувствительность скорости гибели к кислороду	1500 $(\text{мМ})^{-1}$	1500	см. текст
D_{H}	коэффициент миграции		0,0036	см. текст
Нормальные клетки:				
d_{max}	максимальная скорость гибели	0,03	0,03	[58]+ см. текст
k_{O_2}	чувствительность скорости гибели к кислороду	300 $(\text{мМ})^{-1}$	300	см. текст
Капилляры:				
l	скорость разрушения	$5 \cdot 10^{-11}$ (0,015	см. текст

$v_{\text{нор}}$	скорость нормализации	0,1	0,1	см. текст
v^*	константа Михаэлиса для ангиогенеза и денормализации		0,001	см. текст
$v_{\text{ден}}$	скорость денормализации		0,05	см. текст
μ	темп нормализации плотности		0,001	см. текст
γ	эластичность сети	0,5	0,5	см. параграф 1.2
R	максимальная скорость ангиогенеза		0,015	см. текст
C_{max}	максимальная плотность поверхности	$500 \frac{\text{см}^2}{\text{см}^3}$	5	см. текст
Глюкоза:				
$P_{\text{Э.ФС}}$	проницаемость нормальных капилляров	$1,1 \cdot 10^{-8} \frac{\text{см}}{\text{с}}$	4	см. приложение Б
$P_{\text{Э.АС}}$	проницаемость ангиогенных капилляров	$2,8 \cdot 10^{-8} \frac{\text{см}}{\text{с}}$	10	см. приложение Б
$G_{\text{Б}}$	уровень в крови	$5,5 \frac{\text{ммоль}}{\text{л}}$	5,5	[62]
$q_{\text{Г.н1}}$	скорость потребления делящимися клетками опухоли	$9,5 \cdot 10^{-17} \frac{\text{моль}}{\text{клеток} \cdot \text{с}}$	103	[56] + см. текст
$q_{\text{Г.н2}}$	скорость потребления покоящимися клетками опухоли	$2,3 \cdot 10^{-18} \frac{\text{моль}}{\text{клеток} \cdot \text{с}}$	2	см. текст
$q_{\text{Г.н}}$	скорость потребления нормальными клетками	$0,49 \frac{\text{мг}}{\text{мин} \cdot 100 \text{мл}}$	1,6	[63]
G^*	константа Михаэлиса для потребления	0,04 мМ	0,04	[64]
D_G	коэффициент диффузии		94	[65]

Таблица 1. Параметры модели

Параметр	Описание	Значение	Значение в модели	Источник
Кислород:				
$Q_{O_2}^0$	приток при нормальном потоке крови	$20,4 \frac{мМ}{ч}$	20,4	см. параграф 1.6
$Q_2^{арт}$	концентрация в артерии	100 $мМрт.ст.$	0,12	[39]
O_2	концентрация, при которой насыщение гемоглобина 50%	26,5 $мМрт.ст.$	0,033	[66]
n	коэффициент Хилла	2,55	2,55	[66]
$q_{O_2,м}$	скорость потребления делящимися клетками опухоли	$4,4 \cdot 10^{-17} \frac{моль}{клеток \cdot с}$	47	[56] + см. текст
$q_{O_2,м}$	скорость потребления покоящимися клетками опухоли	$1,4 \cdot 10^{-17} \frac{моль}{клеток \cdot с}$	12	см. текст
λ	доля СПК покоящихся клеток опухоли в отсутствие глюкозы		0,3	см. параграф 1.3.2
$q_{O_2,н}$	скорость потребления нормальными клетками	$0,29 \frac{мМ}{мин \cdot 100мМ}$	8	[63]
O_2^*	константа Михаэлиса для потребления	0,005 мМ	0,005	[64]
D_{O_2}	коэффициент диффузии		720	[67]
VEGF:				
p	скорость производства	$1,6 \frac{фг}{час \cdot клеток}$	0,8	[68]
ω	скорость интернализации	$2,8 \cdot 10^{-4} с^{-1}$	1	[60]
$P_{V,PC}$	проницаемость нормальных капилляров	$6,4 \cdot 10^{-8} \frac{см}{с}$	0,02	см. приложение Б
$P_{V,AC}$	проницаемость ангиогенных капилляров	$7,8 \cdot 10^{-7} \frac{см}{с}$	0,28	см. приложение Б
d_V	скорость деградации	$0,01 ч^{-1}$	0,01	[69]
k_A	константа связывания с бевацизумабом	$5,3 \cdot 10^8 М^{-1}с^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{12}$	[70]
D_V	коэффициент диффузии		21,2	[69]
Бевацизумаб:				
$P_{A,PC}$	проницаемость нормальных капилляров	$1,1 \cdot 10^{-9} \frac{см}{с}$	$4 \cdot 10^{-4}$	см. приложение Б
$P_{A,AC}$	проницаемость ангиогенных капилляров	$8,8 \cdot 10^{-8} \frac{см}{с}$	0,032	см. приложение Б
D_A	коэффициент диффузии		14,3	см. приложение Б
d_A	скорость вывода из крови	$0,035 день^{-1}$	0,0014	[71]

Таблица 1. Параметры модели (продолжение)

концентрации кислорода выбраны так, чтобы скорость гибели клеток становилась существенной только при уменьшении их СПК в несколько раз, при том, что нормальные клетки более чувствительны к гипоксии. Коэффициент миграции опухолевых клеток соответствует неинвазивной, компактной опухоли.

Метод описания микроциркуляторной сети через пространственно-распределенные переменные накладывает определенные трудности на оценку значений параметров динамики капилляров, которые, однако, на практике сильно зависят от колоссального количества факторов и варьируются для разных линий опухолевых клеток, различных тканей, состояния здоровья организма и, что более важно, будет отличаться от организма к организму. Поэтому мы ограничиваемся грубыми оценками, цель которых – позволить адекватно воспроизвести общие свойства структуры и динамики микроциркуляторной сети при росте опухоли. Влияние вариации наиболее значимых параметров капилляров, т.е. скорости ангиогенеза, деградации и нормализации капилляров, изучено в параграфе 1.2. Плотность микроциркуляторной сети в различных мышечных моделях опухолей увеличивается в три-шесть раз в течение нескольких дней [73], что определяет порядок величины для максимальной скорости ангиогенеза и позволяет оценить максимум плотности поверхности капилляров. Работа по получению изображений высокого разрешения [74] демонстрирует реконструкцию опухолевой микроциркуляторной сети 280 мм^3 в объеме, по которой видно, что функциональные капилляры практически отсутствуют в ядре опухоли. Наряду с наблюдением, что капилляры внутри опухоли деградируют в течение нескольких дней, это позволяет оценить скорость деградации микрососудов [73]. Скорость денормализации капилляров оценивается так, чтобы микроциркуляторная сеть была почти полностью ангиогенной внутри опухоли, в то время как выбранная скорость нормализации капилляров обеспечивает их возвращение в нормальное состояние через несколько дней, оба наблюдения основаны на данных работы [11]. Константа Михаэлиса для ангиогенеза и денормализации является техническим параметром, необходимым для точного моделирования начала и прекращения этих процессов – при уровнях VEGF, равных этой

константе, скорости процессов равной одной второй от их максимальных значений. Скорость нормализации плотности капилляров подобрана так, что во время антиангиогенной терапии она нормализуется в течение нескольких дней.

1.6 Численное решение

Система уравнений (1)-(4) решалась в одномерной области размером 1 см. Плоская геометрия использовалась для простоты вычислений, так как она не искажает качественные результаты по сравнению с сферически-симметричным случаем. Начальные условия соответствуют нормальной ткани с $h(x,0)=1$, $PC(x,0)=1$, с небольшой колонией пролиферирующих опухолевых клеток шириной 0,1 мм у левой границы, где $n_1(x,0)=1$, $h(x,0)=0$, $NC(x,0)=0$. Первоначальное распределение глюкозы $G(x,0)$ равномерно и рассчитывается как его стационарная концентрация в нормальной ткани. Мы принимаем начальное давление кислорода равным 34 мм рт.ст., что находится в пределах нормального диапазона давления кислорода в покоящейся мышечной ткани [75]. Это приводит к начальному распределению кислорода $O_2(x,0)=0,04$, при этом значение притока кислорода при нормальном кровотоке $Q^0_{O_2}$ устанавливается таким, чтобы это являлось стационарным распределением кислорода. Остальные переменные в начальный момент времени равны нулю. Для всех переменных на левой границе задаются граничные условия нулевого потока; значения переменных на правой границе постоянны и соответствуют нормальной ткани. Скорость конвективного потока установлена равной нулю на левой границе, для нее используется свободное граничное условие на правой границе, что приводит к следующему уравнению для скорости конвективного потока:

$$I(x,t) = \int_0^x \rho [Bn_1(r,t)] dr + D_n \nabla n_2(x,t).$$

Для ускорения расчетов уравнения для VEGF и глюкозы рассматриваются в квазистационарном приближении, ввиду высоких скоростей их реакций по

сравнению со скоростями реакций для других переменных, и решаются методом прогонки. Для других переменных используется метод расщепления на физические процессы, т.е. кинетические уравнения, уравнения диффузии и конвективные уравнения решаются последовательно на каждом временном шаге. Для кинетических уравнений используется метод Рунге-Кутты четвертого порядка, для уравнений диффузии используется схема Кранка-Николсон, конвективные уравнения решаются методом коррекции потоков Бориса-Бука с использованием явной антидиффузионной схемы. Последний метод описан в [76], остальные классические методы описаны во многих книгах, например, в [77]. Вычислительный код реализован на языке C++. Шаги по пространству и времени подобраны таким образом, чтобы минимизировать расчетное время при отсутствии искажений в решении. Для моделирования месяца роста опухоли на среднем домашнем стационарном компьютере требуется не более пяти минут.

2. Результаты

2.1 Модельная симуляция при базовом наборе параметров

На Рисунке 2 продемонстрированы распределения переменных модели при базовом наборе параметров в четыре момента времени. В начале симуляции активность пролиферирующих опухолевых клеток n_1 приводит к локальной деградации нормальной микроциркуляторной сети NC и значительному локальному снижению уровней питательных веществ. Падение концентрации глюкозы G приводит к переходу части клеток в покоящееся состояние n_2 , в котором они производят VEGF V , что стимулирует расширение микроциркуляторной сети путем образования ангиогенных капилляров AC , а также способствует денормализации NC , т.е., их переходу в AC . Падение концентрации кислорода O_2 приводит к гибели небольшого количества нормальных и покоящихся опухолевых клеток с образованием некроза m . Рисунок 2а относится к моменту, когда с начала симуляции прошло 4 дня. Скорость распространения опухоли в этот момент ускоряется вследствие значительного увеличения подачи глюкозы из-за повышенной плотности микроциркуляторной сети, а также повышенной проницаемости ангиогенных капилляров. Это приводит к увеличению общего числа пролиферирующих опухолевых клеток, от которого напрямую зависит скорость распространения опухолевого фронта.

Рисунок 2б относится к 10-му дню симуляции и показывает структуру опухоли и ее микроокружения непосредственно перед началом терапии. Опухолевая масса состоит в основном из живых клеток, причем доля пролиферирующих клеток плавно уменьшается по направлению к ее центру, что отражает длительный дефицит глюкозы в ядре опухоли. Провал в концентрации кислорода внутри опухоли вблизи ее границы хорошо иллюстрирует повышенную СПК пролиферирующими опухолевыми клетками, однако уровень кислорода внутри опухоли еще достаточен для того, чтобы некротический объем не

увеличивался. Значение максимальной общей плотностимикроциркуляторной

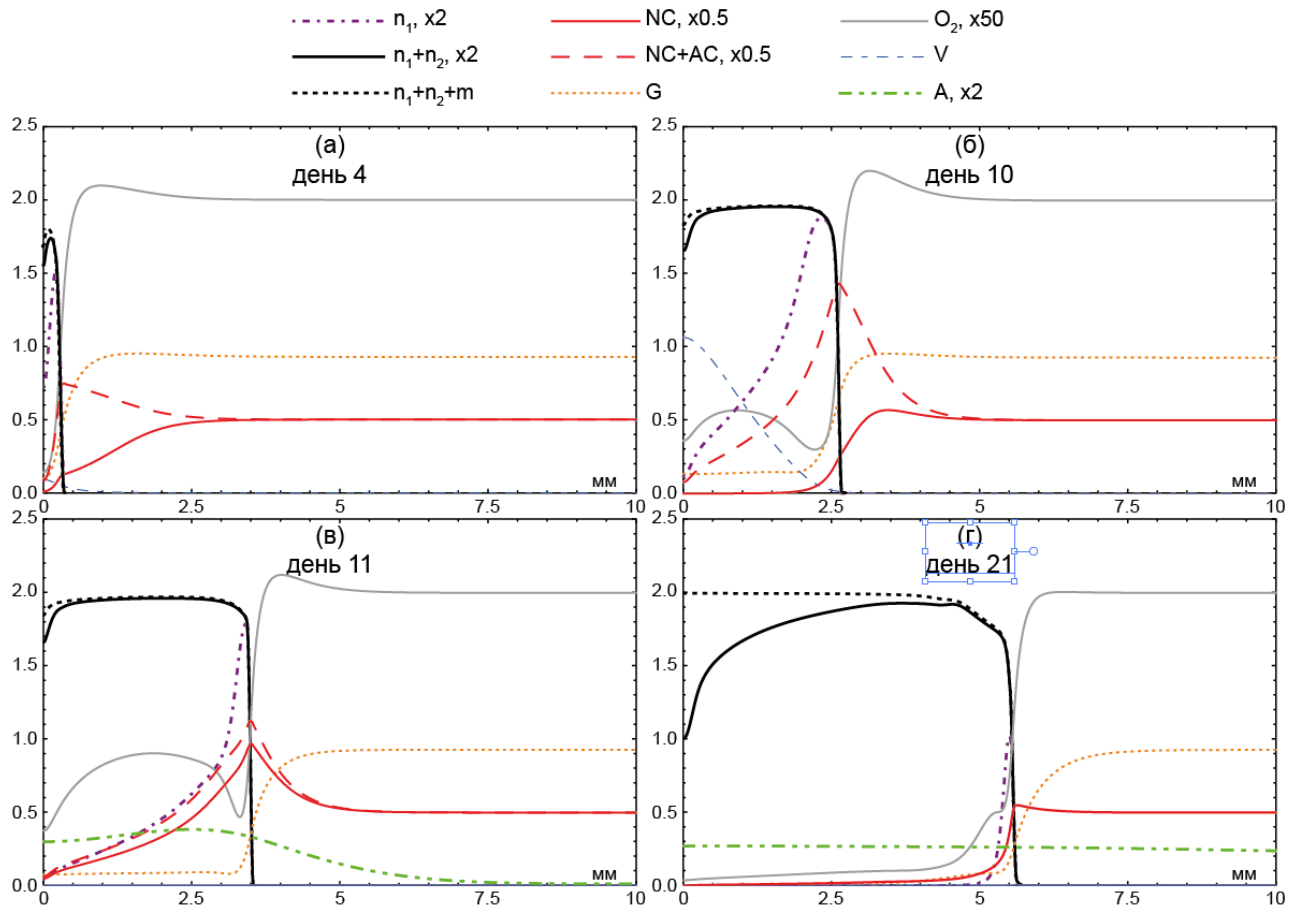


Рисунок 2. Распределения плотностей пролиферирующих опухолевых клеток n_1 , всех опухолевых клеток n_1+n_2 , доли опухоли с некрозом n_1+n_2+m , плотности поверхности нормальной микроциркуляторной сети PC , всей микроциркуляторной сети $PC+AC$, концентраций глюкозы G , кислорода O_2 , VEGF V и бевацизумаба A при базовом наборе параметров в дни: а) 4, б) 10, в) 11 (день введения бевацизумаба), г) 21.

сети установлено в пять раз большим, чем его значение для нормальной ткани, однако, его пятикратное увеличение не может быть достигнуто при используемых значениях параметров, которые определяют быстрый рост опухоли и заметную, но не слишком интенсивную, деградацию капилляров внутри нее – в результате опухоль получает достаточное количество глюкозы для роста, так что плотность капиллярной системы не успевает увеличиться более чем в три раза. Следует отметить, что концентрация VEGF внутри опухоли очень высока по сравнению с концентрацией в перитуморальной области, где, однако, она

достаточна для заметного ангиогенеза. Об усиленном притоке питательных веществ в перитуморальной области свидетельствует пик концентрации кислорода снаружи опухоли. Профиль концентрации глюкозы более плавный, этот контраст обусловлен различием в скоростях поступления питательных веществ в ткани, который намного выше для кислорода из-за гораздо большей проницаемости капиллярных стенок для него.

Введение бевацизумаба *А*, моделируемое резким увеличением его концентрации в крови, происходит, когда опухоль достигает радиуса 3 мм, на 249-й час симуляции, и сильно влияет на распределение модельных переменных, как видно на Рисунке 2в, который соответствует концу 11-го дня, когда после инъекции препарата прошло 15 часов. Нейтрализация VEGF приводит к прекращению образования новых капилляров и быстрой нормализации структуры уже существующих. Хотя капиллярная система может медленно вернуться к своей нормальной плотности сам по себе, этот процесс происходит в основном за счет продолжающегося разрушения капилляров внутри опухоли, рост которой не прекращается, а только замедляется. Следует отметить, что профиль бевацизумаба на Рисунке 2в указывает на то, что его приток в ткани происходит главным образом через ангиогенные капилляры, которые обладают в 80 раз большей проницаемостью для него.

Средняя концентрация кислорода внутри опухоли, которая до введения бевацизумаба испытывала значительное падение в начале роста опухоли с последующей стабилизацией при активном распространении опухолевого фронта, теперь явно увеличивается, в то время как концентрация глюкозы уменьшается. Сложная динамика модели приводит к этому результату следующим образом. С начала ААТ снижение притока глюкозы, вызванное нормализацией и деградацией капилляров без их дальнейшего образования, немедленно приводит к снижению концентрации глюкозы (приток глюкозы через разные типы капилляров различается в 2,5 раза). Пролиферирующие опухолевые клетки начинают активно переходить в покоящееся состояние, в котором они потребляют меньше питательных веществ, поскольку концентрация глюкозы непосредственно

определяет скорость этого перехода. Наряду с тем, что уровень потребления глюкозы также падает под ее низких концентрациях согласно кинетике Михаэлиса-Ментен, это приводит к общему снижению потребления глюкозы, что замедляет дальнейшее падение ее уровня, который, тем не менее, в конечном итоге становится ниже, чем до инъекции бевацизумаба. СПК опухолевых клеток также уменьшается при их переходе в состояние покоя. При этом на приток кислорода не влияет нормализация капилляров, так как гидродинамические сопротивления и проницаемость различных типов капилляров для кислорода равны – первое является модельным допущением, приводящим к отсутствию изменений кровотока в капиллярах при их нормализации, второе является следствием свободной диффузии кислорода через стенки капилляров (см. параграф 1.3). Таким образом, уменьшенная скорость потребления кислорода при его неизменном притоке приводит к повышению его уровня внутри опухоли. Следует отметить, что, в отличие от рассмотренной выше динамики глюкозы, в случае с кислородом нет отрицательной обратной связи, которая бы сдерживала увеличение его концентрации, поскольку сам по себе этот процесс не приводит к ускорению скорости пролиферации опухоли и последующему увеличению его потребления, как это происходит в при повышении уровня глюкозы.

Существует также другая особенность метаболизма опухоли в этой модели, которая должна, по крайней мере теоретически, усиливать эффект снижения гипоксии во время ААТ. Внутренняя часть опухоли, которая через короткое время после введения бевацизумаба состоит почти полностью из покоящихся клеток, испытывает продолжающееся снижение уровня глюкозы. Согласно модельным предположениям (см. параграф 1.3.2), это приводит к уменьшению их СПК, что должно привести к дальнейшему увеличению уровня кислорода. Конечно, глюкоза не является единственным питательным веществом, окисляемым опухолевыми клетками для получения энергии, но ясно, что приток других питательных веществ, если бы они были явно рассмотрены в модели, также уменьшался бы при ААТ – при этом, чем больше молекулярная

масса вещества, тем значительнее будет падение его притока. Более того, приток лактата, который активно производится пролиферирующими клетками и может использоваться в качестве субстрата для ОКФОС покоящихся клеток, также будет замедляться при переходе клеток в состояние покоя.

На рисунок 2г показано распределение модельных переменных на 21-й день роста опухоли. Видно, что продолжающаяся деградация микроциркуляторной сети внутри опухоли в конечном итоге приводит к уменьшению концентрации кислорода, которая становится даже ниже, чем до терапевтического вмешательства, что приводит к активному образованию некроза в ядре новообразования. Следует отметить, что хотя в это время происходит отток бевацизумаба из ткани в кровь, его уровень как в ткани, так и в крови, остается значительным из-за его медленного выведения препарата из крови – таким образом, антиангиогенный эффект длится десятки дней после одиночного введения препарата.

На рисунке 3 продемонстрировано изменение среднего давления кислорода в опухоли для рассмотренной модельной симуляции (так как в ткани присутствует только свободный кислород, его давление линейно пропорционально его концентрации). Серая область обозначает период облегчения гипоксии, который определяется здесь как период, в течение которого среднее давление кислорода в опухоли выше его значения непосредственно перед началом ААТ. Это значение с хорошей точностью сохраняется при свободном росте опухоли. Период облегчения гипоксии длится около 5 дней, в течение него давление кислорода увеличивается в $\sim 1,8$ раз, 7,8 мм рт.ст. до 13,8 мм рт. ст., падая после его окончания ниже дотерапевтического уровня. Эти результаты находятся в хорошем количественном согласии с динамикой кислорода в опухолях, продемонстрированной в различных экспериментах на мышинных моделях опухолей, таких как те, которые проводились в работе [12], где также измерялась перфузия опухолей и было обнаружено, что она увеличивается после инъекции антиангиогенного агента, и [11], где перфузия опухоли не измерялась, но наблюдалась активная нормализация микрососудов при ААТ. Полученные результаты

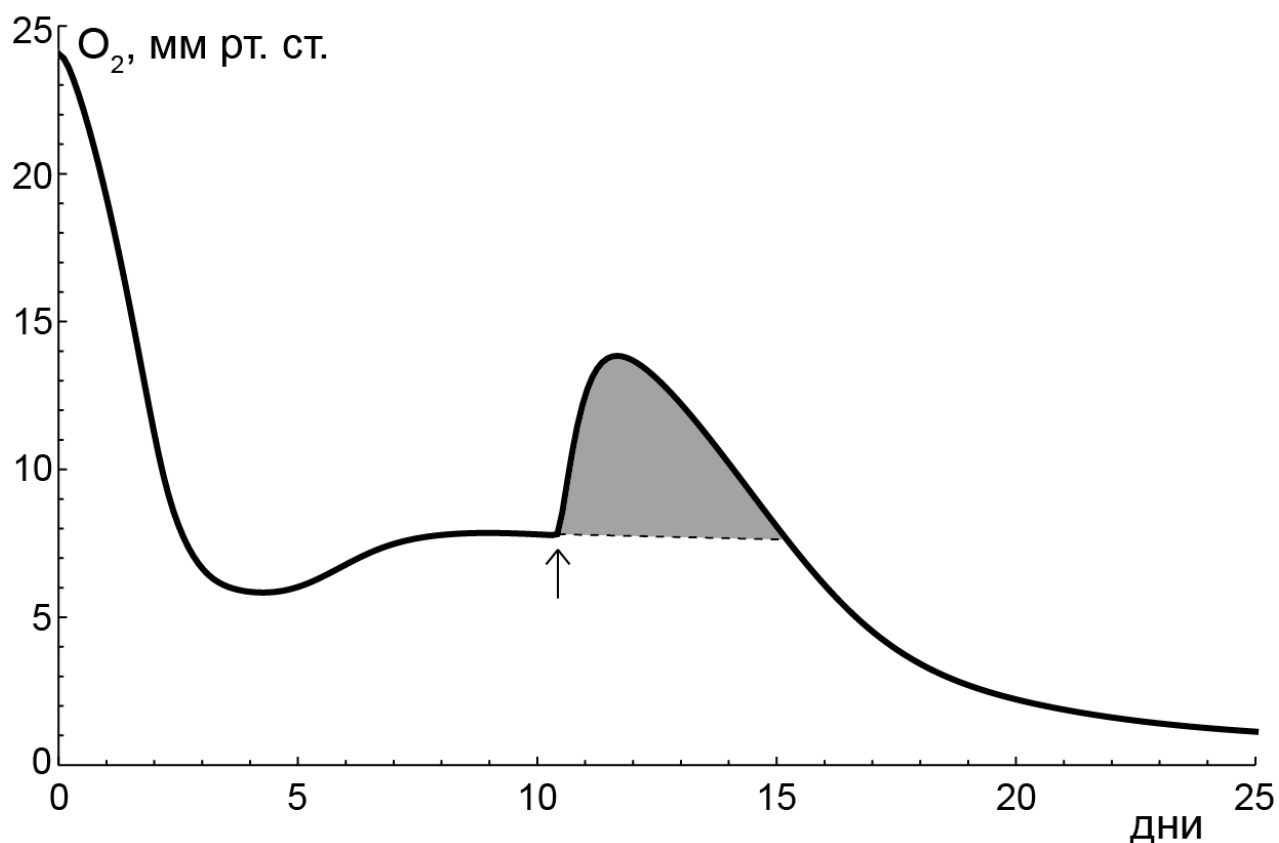


Рисунок 3. Среднее давление кислорода внутри опухоли, на которое влияет введение бевацизумаба в момент, когда опухоль достигает радиуса 3 мм, при базовом наборе параметров, приведенном в таблице 1. Стрелка указывает на момент начала терапии. Серая область обозначает дополнительную площадь под графиком в сравнении со случаем свободного роста опухоли, отмеченного пунктирной линией.

свидетельствуют о том, что уменьшение СПК опухоли, вызванное антиангиогенным лечением, может по меньшей мере в некоторых случаях быть столь же важной причиной временного облегчения гипоксии, как и увеличение потока крови в опухоли.

Как показывают результаты указанных экспериментальных работ, проведение радиотерапии во время достижения пика концентрации кислорода внутри опухоли обеспечивает наилучший терапевтический ответ по сравнению с другими графиками лечения, включающими антиангиогенную и радиотерапию. В работе [11] было проведено пять отдельных исследований с использованием трех линий опухолевых клеток и двух антиангиогенных препаратов, бевацизумаба и ангинекса, последний из которых нарушает адгезию эндотелиальных

клеток к внеклеточному матриксу и ингибирует их миграцию, что приводит к прекращению ангиогенеза (и, аналогично случаю с бевацизумабом, также ведет к кратковременной нормализации микрососудов). В среднем, проведение лучевой терапии на 2-й день после начала ААТ (когда концентрация кислорода внутри опухолей была близка к максимальной в каждом случае) приводило к 70%-ному снижению скорости роста опухоли для случаев, когда опухоль продолжала расти, при этом в одном из экспериментов опухоли даже уменьшались в размере и не возобновляли свой рост (ААТ начиналась в каждом случае, когда опухоли достигали радиусов 100мм^3 , а конечными точками являлись моменты, когда опухоли достигали 400мм^3). При этом схема, где лучевая терапия проводилась за два дня до ААТ, и монорадикотерапия, приводили к снижению скорости роста опухоли только на 35% и 30% соответственно (никогда не приводя к спящим опухолям), тогда как моно-ААТ лишь незначительно влияла на рост опухоли в каждом случае. Результаты работы [12] где использовался другой анти-VEGF-агент талидомид, очень похожи, хотя сама моно-ААТ оказалась более эффективной для мышинной модели опухоли, используемой в ней.

2.2 Влияние параметров на динамику кислорода внутри опухоли

Эффект временного облегчения внутриопухолевой гипоксии, продемонстрированный выше для конкретных значений параметров, сохраняется при широком физиологически обоснованном варьировании параметров модели, что означает, что это явление объективно возникает из общих особенностей динамики опухоли, отраженных в этой модели, а не просто представляет собой пример сложного нелинейного эффекта, который бы проявлялся в локальной узкой области в пространстве параметров. Детальный параметрический анализ системы уравнений (1)-(4) является очень сложной и вряд ли выполнимой задачей, поскольку модель содержит 45 параметров и не все они непосредственно связаны с рассматриваемым эффектом. Вместо этого здесь мы демонстрируем результаты вариации шести параметров, которые с первого взгляда могут быть

ключевыми для динамики кислорода внутри опухоли во время антиангиогенной терапии. Первым параметром является предел скорости перехода пролиферирующих опухолевых клеток в состояние покоя k_1 , когда концентрация глюкозы стремится к нулю. Поскольку повышение уровня кислорода связано с уменьшением его общего потребления опухолевыми клетками, которое происходит благодаря этому переходу, можно ожидать, что чем быстрее клетки перейдут в состояние покоя, тем быстрее концентрация кислорода достигнет своего пикового значения. Вторым параметром q_{O_2,n_2} – СПК покоящимися опухолевыми клетками при нормальных уровнях питательных веществ. Хотя его базовое значение связано со скоростью потребления глюкозы предположением, что они производят АТФ главным образом путем окисления глюкозы, q_{O_2,n_2} также может иметь как более высокие значения, например, если скорости окисления других субстратов сравнимы со скоростью для глюкозы, так и более низкие, например, если аэробный гликолиз не прекращается полностью в покоящихся клетках. Значение q_{O_2,n_2} , а точнее, его отношение к СПК пролиферирующих клеток, должно определять амплитуду увеличения давления кислорода при переходе клеток в состояние покоя. Третий параметр, λ , представляет собой долю СПК покоящихся опухолевых клеток в отсутствие глюкозы от ее значения при ее нормальном уровне, что определяет снижение СПК покоящихся клеток при снижении концентрации глюкозы, описывая тем самым замедление метаболизма опухолевых клеток при сильной нехватке питательных веществ. Четвертым параметром, v_{nor} , является скорость нормализации ангиогенных капилляров, которая определяет, как быстро уменьшается общая проницаемость капилляров для глюкозы и, следовательно, ее приток в опухоль, что ускоряет переход клеток в состояние покоя. Пятый и шестой параметры, R и l , являются максимальной скоростью ангиогенеза и скоростью деградации капилляров соответственно. Это основные параметры, которые определяют объем функциональных капилляров в микроокружении опухоли, что, в свою очередь, определяет скорость поступления глюкозы в опухоль и, следовательно, степень ее изменения после инъекции бевацизумаба. На Рисунке 4 показана зависимость среднего

давления кислорода внутри опухоли от времени при разных значениях шести рассмотренных параметров. В каждой модельной симуляции инъекция бевацизумаба происходит в тот момент, когда радиус опухоли достигает 3 мм.

Вариация k_I в физиологически обоснованном диапазоне изображена на Рисунке 4а, из которого видно, что этот параметр не оказывает заметного влияния на форму кривой, но его вариация сдвигает ее так, что максимальное давление кислорода, а также его значение сразу до терапии немного увеличиваются по мере увеличения k_I . Этот сдвиг связан с тем, что изменения в функции перехода опухолевых клеток в состояние покоя влияют на свободный рост опухоли, изменяя баланс ее пролиферирующих и мигрирующих клеток и, таким образом, влияя на общую СПК опухоли, а следовательно, и на давление кислорода внутри опухоли. Скорость роста опухоли также находится под влиянием этого параметра, так что опухоль достигает радиуса 3 мм в разные моменты времени. Однако, несмотря на то, что в этих симуляциях потенциальная скорость перехода пролиферирующих клеток в состояние покоя при полном отсутствии глюкозы различается в несколько раз, реальная величина скорости этого перехода, определяемая функцией $P_I(G)$ (см. уравнения (1)), корректируется во время роста опухоли таким образом, что изменение vk_I оказывает незначительное влияние на динамику кислорода во время антиангиогенной терапии. Удивительно, что $P_I(G)$ вблизи центра опухоли непосредственно перед инъекцией бевацизумаба практически одинакова в каждой из симуляций ($\sim 0,028$). Это можно объяснить тем, что при одной и той же начальной концентрации глюкозы более высокая скорость перехода клеток в состояние покоя приводит к увеличению доли покоящихся клеток и, следовательно, к снижению общего потребления глюкозы и к более высокой концентрации глюкозы внутри опухоли, что замедляет скорость перехода. Таким образом, система противодействует стремлению опухолевых клеток перейти в состояние покоя.

Значительное увеличение диапазона вариации k_I физиологически неоправданно. Его более высокие значения будут означать, что опухолевые клетки реагируют на метаболический стресс, переходя в состояние покоя

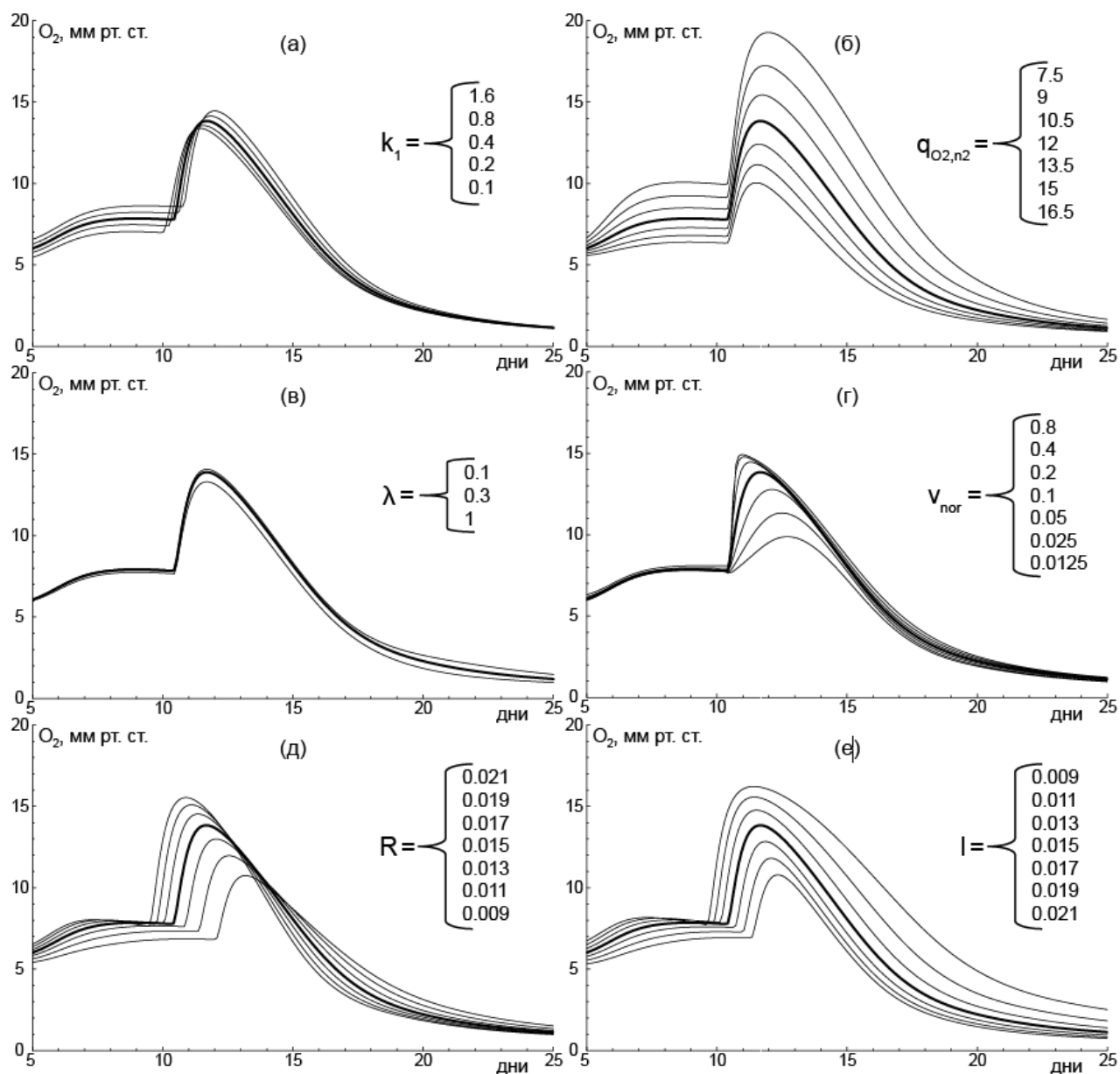


Рисунок 4. Среднее давление кислорода внутри опухоли, на которое влияет введение бевацизумаба в момент, когда опухоль достигает радиуса 3 мм, при вариации а) максимальной скорости перехода опухолевых клеток в состояние покоя k_1 , б) скорости потребления кислорода покоящимися опухолевыми клетками q_{O_2, n_2} , в) доли скорости потребления кислорода покоящимися опухолевыми клетками в отсутствие глюкозы λ , г) скорости нормализации капилляров v_{nor} , д) максимальной скорости ангиогенеза R , е) скорости деградации капилляров внутри опухоли l . Значения варьируемых параметров приведены на соответствующих рисунках, при этом верхние/нижние значения соответствуют верхним/нижним графикам, а средние значения, как и значения неварьируемых параметров, взяты из базового набора, приведенного в таблице 1. Все графики, соответствующие симуляции при базовом наборе параметров, выделены жирной линией.

за несколько минут или быстрее, что маловероятно, поскольку клетки в первое время будут сопротивляться остановке клеточного цикла, используя накопленные внутри них питательные вещества. Значительное уменьшение k_I предполагает, что клетки почти не реагируют на снижение притока глюкозы и продолжают размножаться при его тяжелом истощении, что невозможно. Однако даже с чисто математической точки зрения график уровня кислорода от временем не меняет своей формы вплоть до достижения экстремальных значений k_I . Он продолжает смещаться в сторону таким же способом, в то время как время достижения пикового значения давления кислорода действительно уменьшается с увеличением k_I , как было предложено выше, но незначительно из-за вышеупомянутого механизма сдерживания. При низких значениях k_I кривая начинает заметно сглаживаться, что понятно, так как значение $k_I=0$ должно буквально приводить к отсутствию эффекта снижения гипоксии.

Изменение СПК покоящимися клетками оказывает гораздо более сильное влияние на динамику кислорода. Общая СПК опухоли напрямую влияет на уровень кислорода, и даже умеренное изменение q_{O_2,n_2} заметно влияет на дотерапевтический и пиковый значения давления кислорода, а также на продолжительность окна снижения гипоксии, которое изображено на Рисунке 4б. Поскольку доля покоящихся клеток увеличивается во время ААТ, с уменьшением q_{O_2,n_2} увеличивается отношение дотерапевтического и пикового значений давления кислорода, которое варьируется от 1,59 до 1,94 для рассматриваемой вариации. При этом в отличие от случая с вариацией k_I , рост опухоли остается практически неизменным как до, так и после инъекции бевацизумаба, в то время как единственной наблюдаемой разницей является более раннее образование некроза при более высоких значениях q_{O_2,n_2} , так как оно вызвано низкими концентрациями кислорода.

Введение в модель параметра λ диктуется предположением, что опухолевые клетки при метаболическом стрессе должны замедлять свой метаболизм, чтобы продлить выживание, при этом λ определяется как отношение СПК покоящихся опухолевых клеток при отсутствии глюкозы и при ее нормальном

уровне. Из этого определения следует, что этот параметр может принимать значения в диапазоне от 0 до 1. Было высказано предположение, что уменьшение СПК покоящихся клеток может продлить эффект облегчения гипоксии внутри опухоли. Однако, как показано на Рисунке 4в, где нижний график относится к случаю с $\lambda=1$ и, следовательно, не учитывает замедление метаболизма покоящихся клеток, влияние этого эффекта на динамику кислорода очень слабо. Изменение СПК клеток из-за их перехода из пролиферирующего состояния состояние покоя намного больше, чем само по себе СПК покоящихся клеток, поэтому вариация последнего может приводить лишь к небольшим изменениям в динамике модели и сама по себе не оказывает существенного эффекта. В период снижения гипоксии часть СПК покоящихся клеток, описывающая окисление глюкозы, уменьшается незначительно (например, от $\sim 0,95$ в центре опухоли до проведения терапии до $0,92-0,93$ при $\lambda=0,1$), так как концентрация глюкозы остается на порядок выше, чем значение G^* , то есть концентрация глюкозы, при которой ее расход и, следовательно, скорость окисления падает вдвое. Более того, поскольку СПК также зависит от концентрации самого кислорода в соответствии с кинетикой Михаэлиса-Ментен, ее значение даже увеличивается во время окна облегчения гипоксии (от $0,63$ до $0,72$ от ее максимального значения при $\lambda=0,1$). После окончания окна облегчения гипоксии концентрация глюкозы монотонно падает с деградацией капилляров, что приводит к уменьшению СПК. Концентрация кислорода также падает, что также ведет к уменьшению СПК, поэтому падение уровня глюкозы лишь немного ускоряет его снижение, но не играет в нем существенной роли. Конечно, результат относительной незначительности λ получен здесь при определенном наборе значений других параметров модели и с использованием определенных форм функций, но ясно, что этот результат будет сохраняться и при других условиях, при условии, что СПК пролиферирующих опухолевых клеток значительно выше, чем у покоящихся.

На Рисунке 4г показано давление кислорода от времени для разных значений скорости нормализации капилляров v_{nor} . Этот параметр вряд ли возмож-

но измерить *in vivo*, однако известно, что проницаемость микрососудов заметно изменяется под действием анти-VEGF агента в течение несколько часов (см., например, [9]). Предполагая, что нормализация капилляров должна зависеть от большого количества физиологических факторов, мы меняем v_{nor} в довольно широком диапазоне. Эта вариация показывает, что модификация скорости изменения притока глюкозы, на которую напрямую влияет эта вариация, играет гораздо более важную роль, чем k_l , при определении скорости перехода опухолевых клеток в состояние покоя, и следовательно, в скорости повышения концентрации кислорода внутри опухоли, которая значительно замедляется с уменьшением v_{nor} . Разумеется, с его дальнейшим уменьшением могут быть достигнуты значения, при которых облегчение гипоксии опухоли не происходит, однако эти значения являются нефизиологически низкими. При высоких значениях скорости нормализации капилляров график давления кислорода от времени приближается к предельной кривой, которая относится к случаю мгновенного изменения проницаемости капилляров к глюкозе, при этом предельное значение пикового давления кислорода превышает его значение до терапии в два раза. Поскольку из-за ААТ образование новых капилляров прекращается, а затем капилляры деградируют с одинаковой скоростью при разных модельных симуляциях, приток кислорода к опухоли, а также давление кислорода внутри опухоли, неизбежно падают, поэтому графики его давления от времени практически сливаются в один после прохождения периода облегчения гипоксии.

Максимальная скорость ангиогенеза R и скорость деградации капилляров l являются основными параметрами, которые определяют степень опухолевой васкуляризации, которая напрямую влияет на приток питательных веществ и, следовательно, на скорость роста опухоли, являясь важным клиническим прогностическим фактором, коррелирующим с исходом пациентов (см., например, [78]). На Рисунках 4д,е показаны зависимости среднего уровня кислорода в опухоли от времени при вариациях R и l соответственно. Хотя R и l относятся к противоположным действиям образования и деградации капилляров, эти действия отличаются тем, что образование капилляров может происхо-

дить как внутри, так и вне опухоли при достаточной локальной концентрации VEGF, тогда как их деградация ограничена объемом, занятым опухолью. В целом это приводит к образованию ангиогенной части микроциркуляторной сети, прилегающей к опухоли. Обе группы графиков выглядят одинаково в начале роста опухоли, при этом внутриопухолевое давление кислорода падает с уменьшением васкуляризации опухоли. Остановка ангиогенеза отражается более крутыми склонами графиков на Рисунке 4д после прохождения пика давления кислорода, поскольку при ААТ значение R эффективно обращается в нуль, а l остается неизменным.

Следует отметить, что при высоких значениях R и низких значениях l картина роста опухоли изменяется так, что давление кислорода не достигает равновесия перед инъекцией бевацизумаба, поскольку больший приток питательных веществ сначала приводит к более высокому уровню кислорода, но затем, поскольку доля пролиферирующих клеток увеличивается быстрее из-за увеличения поступления глюкозы, общая СПК опухоли растет и давление кислорода падает. Однако следует отметить, что при этих значениях, соответствующих плотной структуре микроциркуляторной сети, ее плотность внутри опухоли находится вблизи значений, сравнимых с нормальным, а наибольшее значение R соответствует очень быстрому ангиогенезу, а именно удвоению плотности капиллярной сети за 1,4 дня, и обе эти характеристики едва ли достижимы в реальности. Напротив, сильное увеличение скорости деградации, а также снижение скорости ангиогенеза до полного его отсутствия физиологически обоснованы, и такие изменения приведут к дальнейшему ослаблению эффекта облегчения опухолевой гипоксии.

На Рисунке 5 показано, как облегчение внутриопухолевой гипоксии во время ААТ зависит от одновременного изменения свойств динамики микрососудов, а именно, скорости деградации и нормализации капилляров, l и v_{nor} . Поскольку повышенное давление кислорода внутри опухоли на практике приведет к повышению эффективности лучевой терапии, мы сравниваем между симуляциями не продолжительность окна снижения гипоксии или максимальное

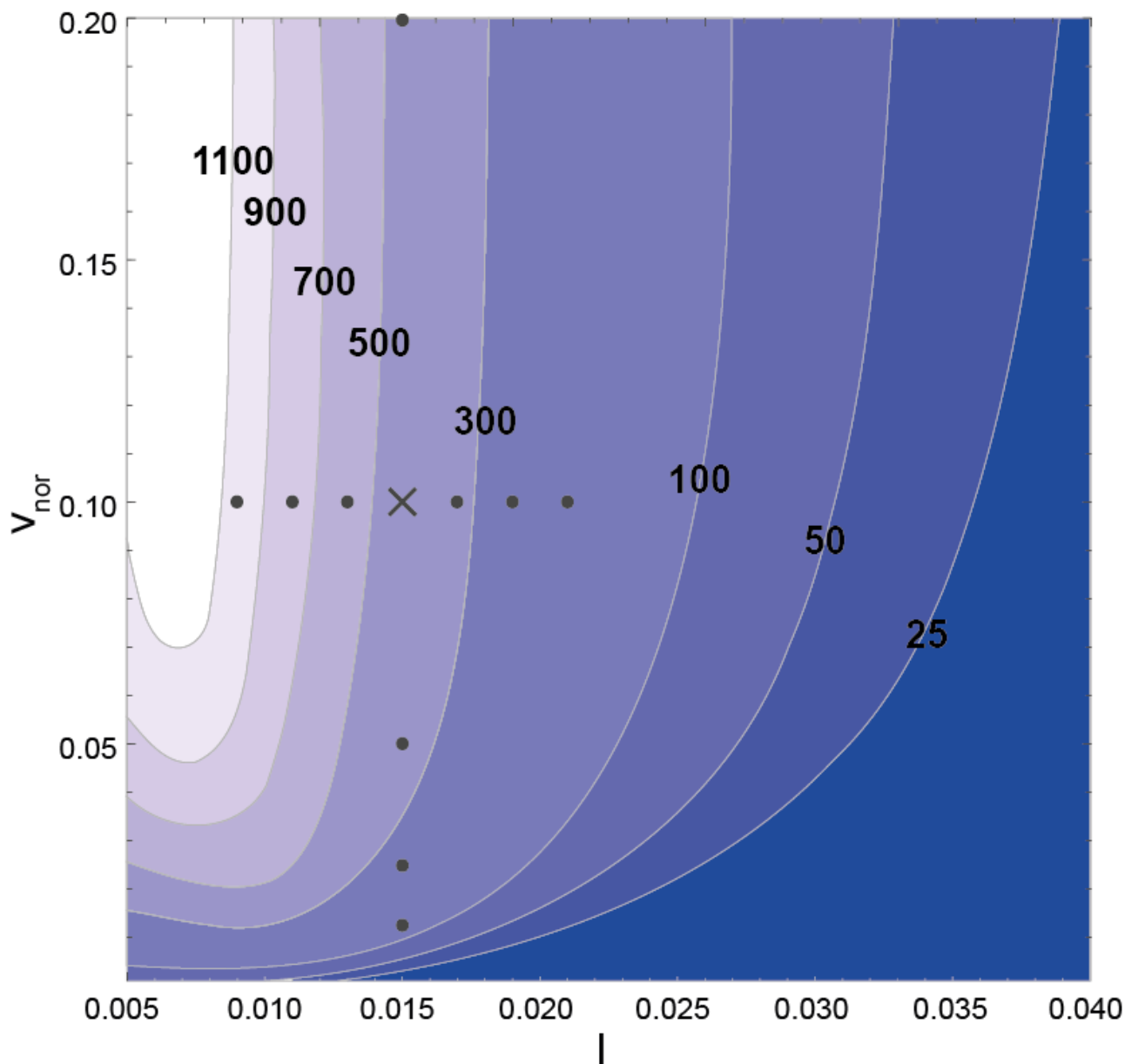


Рисунок 5. Значение дополнительной площади под графиком давления кислорода от времени по сравнению со случаем свободного роста опухоли в зависимости от скорости деградации капилляров l и скорости их нормализации v_{nor} . Значения дополнительной площади под графиком измерены в мм рт. ст.·ч. Значения других параметров модели взяты из базового набора параметров, перечисленных в таблице 1. Крестик обозначает основные значения параметров, для которых график давления кислорода от времени показан на Рисунке 3. Точки обозначают значения параметров, для которых графики давления кислорода во времени показаны на Рисунках 4г,е.

значение давления кислорода во время него, а интегральную характеристику «дополнительной площади под графиком», которая, например, обозначена как серая область на Рисунке 5 и является разностью между площадью под графиками

ком давления кислорода от времени во время окна уменьшения гипоксии, то есть когда давление кислорода превышает его значение до терапии, и произведением этого значения на продолжительность облегчения гипоксии.

Рисунок 5 позволяет предположить, что l является относительно более важным параметром, чем v_{nor} , так что при используемых значениях других параметров модели достаточно быстрая деградация капилляров внутри опухоли приводит к исчезновению эффекта облегчения гипоксии при любой скорости нормализации капилляров, а при высокой васкуляризации опухоли этот эффект выражен даже при нефизиологически медленной скорости нормализации капилляров опухоли.

Заключение

В этой работе с помощью математического моделирования был исследован эффект временного облегчения внутриопухолевой гипоксии в первые дни антиангиогенной терапии. Этот эффект был продемонстрирован для различных мышинных моделей опухолей, однако он оказался не универсальным явлением, так как в некоторых случаях он не был обнаружен (см. [79], где проведен обзор экспериментов обоих типов). В большинство исследований улучшение опухолевого кровотока, вызванное нормализацией структуры капилляров, указано как основная причина усиления оксигенации опухоли. Однако влияние антиангиогенной терапии на опухолевый кровоток также оказалось неоднозначным как в мышинных моделях опухолей [16], так и в клинике [18]. В данном случае мы предположили, что увеличение кровотока может быть не единственной причиной временного повышения уровня кислорода в опухоли во время антиангиогенной терапии и что оно может проявляться даже в отсутствие изменений в кровотоке и, следовательно, не изменяющемся притоке кислорода в опухоль, являясь следствием уменьшения общей скорости потребления кислорода опухолью из-за снижения уровня пролиферации опухоли, вызванного нехваткой питательных веществ.

Мы проиллюстрировали нашу гипотезу посредством численного моделирования роста опухоли в ткани, затронутого инъекцией бевацизумаба, и мы исследовали влияние изменения параметров модели на динамику кислорода во время антиангиогенной терапии. Используемая модель учитывает наиболее важные особенности роста опухоли, фокусируясь на достоверном описании притока питательных веществ и метаболизма опухоли, и пренебрегая при этом изменениями кровотока при нормализации структуры капилляров. Ключевой отличительной чертой используемой модели является одновременное рассмотрение двух основных питательных веществ, кислорода и глюкозы. Это, в част-

ности, позволяет проиллюстрировать тот факт, что их притоки изменяются по-разному во время нормализации микроциркуляции из-за ААТ. Модельные симуляции показали, что временное облегчение внутриопухолевой гипоксии происходит в довольно широком диапазоне физиологически обоснованных значений параметров и позволило указать основные факторы, определяющие динамику кислорода во время антиангиогенной терапии. Конечно, включение увеличения кровотока из-за нормализации капилляров в модель только усилит проявление рассматриваемого явления. Кроме того, было показано, что нормализация капилляров является одним из основных факторов, влияющих на динамику кислорода, следовательно, ее влияние будет более значительным.

Разработанная модель является одной из немногих из существующих в литературе моделей роста опухоли, которые одновременно учитывают динамику и потребление двух основных питательных веществ. Кроме того, она учитывает различия в проницаемости нормальных капилляров и опухолевых ангиогенных капилляров для разных веществ, что также редко встречается в опубликованных моделях опухолевого роста. При этом оба этих свойства необходимы для демонстрации рассматриваемого эффекта. Другим заметным свойством модели является возможность моделирования роста конвективной опухоли путем прямого рассмотрения поля скорости, возникающего из-за динамики опухолевых клеток. Большинство существующих пространственно-распределенных моделей роста опухоли либо не учитывают конвективный рост, либо имитируют его как предельный случай низкой, но ненулевой диффузии и достаточно высокой скорости пролиферации опухолевых клеток.

Модель способна предоставить адекватное иллюстративное моделирование роста опухоли и антиангиогенной терапии. Хотя ее основная цель – воспроизвести облегчение внутриопухолевой гипоксии после инъекции бевацизумаба, она, безусловно, могут служить основой для создания моделей, ориентированных на другие явления, которые сопровождают рост и терапию опухоли. Однако некоторые из потенциальных целей такого рода потребуют довольно радикальных усовершенствований модели, чтобы обеспечить всестороннее исследо-

вание, среди которых учитывается зависимость потока крови от структуры капилляров, поскольку это потребует детального рассмотрения микроциркуляторной сети. Однако модель на данном этапе разработки уже позволяет получить информацию о конкретных свойствах роста опухоли и, более того, воспользоваться вероятно, самым ценным свойством математического моделирования, а именно, возможностью исследовать изолированное влияние особенностей выбранной системы на ее поведение, что является довольно сложной, когда вообще возможной, и часто дорогой задачей при работе с реальными сложными биологическими системами.

Список литературы

- [1] J. Holash, P. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. Alexander, D. Zagzag, G. Yancopoulos, S. Wiegand, Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF, *Science* 284 (1999) 1994–1998.
- [2] R. Araujo, D. McElwain, New insights into vascular collapse and growth dynamics in solid tumors, *Journal of Theoretical Biology* 228 (2004) 335–346.
- [3] D. Hanahan, R. A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *cell* 100 (2000) 57–70.
- [4] D. Fukumura, R. K. Jain, Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization, *Microvascular research* 74 (2007) 72–84.
- [5] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the epr effect in macromolecular therapeutics: a review, *Journal of controlled release* 65 (2000) 271–284.
- [6] N. Ferrara, H.-P. Gerber, J. LeCouter, The biology of vegf and its receptors, *Nature medicine* 9 (2003) 669–676.
- [7] D. R. Senger, L. Water, L. F. Brown, J. A. Nagy, K.-T. Yeo, T.-K. Yeo, B. Berse, R. W. Jackman, A. M. Dvorak, H. F. Dvorak, Vascular permeability factor (vpf, vegf) in tumor biology, *Cancer and Metastasis Reviews* 12 (1993) 303–324.
- [8] B. M. Fu, S. Shen, Structural mechanisms of acute vegf effect on microvessel permeability, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 284 (2003) H2124–H2135.
- [9] F. Yuan, Y. Chen, M. Dellian, N. Safabakhsh, N. Ferrara, R. K. Jain, Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996) 14765–14770.
- [10] M. S. Gee, W. N. Procopio, S. Makonnen, M. D. Feldman, N. M. Yeilding, W. M. Lee, Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy, *The American journal of pathology* 162 (2003) 183–193.

- [11] R. P. Dings, M. Loren, H. Heun, E. McNiel, A. W. Griffioen, K. H. Mayo, R. J. Griffin, Scheduling of radiation with angiogenesis inhibitors anginex and avastin improves therapeutic outcome via vessel normalization, *Clinical Cancer Research* 13 (2007) 3395–3402.
- [12] R. Ansiaux, C. Baudalet, B. F. Jordan, N. Beghein, P. Sonveaux, J. De Wever, P. Martinive, V. Grégoire, O. Feron, B. Gallez, Thalidomide radiosensitizes tumors through early changes in the tumor microenvironment, *Clinical Cancer Research* 11 (2005) 743–750.
- [13] R. K. Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy, *Science* 307 (2005) 58–62.
- [14] M. F. Milosevic, A. W. Fyles, R. P. Hill, The relationship between elevated interstitial fluid pressure and blood flow in tumors: a bioengineering analysis, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 43 (1999) 1111–1123.
- [15] E. M. Sevick, R. K. Jain, Viscous resistance to blood flow in solid tumors: effect of hematocrit on intratumor blood viscosity, *Cancer research* 49 (1989) 3513–3519.
- [16] M. Franco, S. Man, L. Chen, U. Emmenegger, Y. Shaked, A. M. Cheung, A. S. Brown, D. J. Hicklin, F. S. Foster, R. S. Kerbel, Targeted anti-vascular endothelial growth factor receptor-2 therapy leads to short-term and long-term impairment of vascular function and increase in tumor hypoxia, *Cancer research* 66 (2006) 3639–3648.
- [17] K. J. Williams, B. A. Telfer, S. Brave, J. Kendrew, L. Whittaker, I. J. Stratford, S. R. Wedge, ZD6474, a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling, combined with radiotherapy, *Clinical Cancer Research* 10 (2004) 8587–8593.
- [18] T. T. Batchelor, E. R. Gerstner, K. E. Emblem, D. G. Duda, J. Kalpathy-Cramer, M. Snuderl, M. Ancukiewicz, P. Polaskova, M. C. Pinho, D. Jennings, et al., Improved tumor oxygenation and survival in glioblastoma patients who show increased blood perfusion after cediranib and chemoradiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (2013) 19059–19064.

- [19] A. G. Sorensen, K. E. Emblem, P. Polaskova, D. Jennings, H. Kim, M. Ancukiewicz, M. Wang, P. Y. Wen, P. Ivy, T. T. Batchelor, et al., Increased survival of glioblastoma patients who respond to antiangiogenic therapy with elevated blood perfusion, *Cancer research* 72 (2012) 402–407.
- [20] M. Curtarello, E. Zulato, G. Nardo, S. Valtorta, G. Guzzo, E. Rossi, G. Esposito, A. Msaki, A. Past`o, A. Rasola, et al., Vegf-targeted therapy stably modulates the glycolytic phenotype of tumor cells, *Cancer research* 75 (2015) 120–133.
- [21] J. R. Levick, *An introduction to cardiovascular physiology*, Butterworth-Heinemann, 2013.
- [22] T. Hawighorst, M. Skobe, M. Streit, Y.-K. Hong, P. Velasco, L. F. Brown, L. Riccardi, B. Lange-Asschenfeldt, M. Detmar, Activation of the tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth, *The American journal of pathology* 160 (2002) 1381–1392.
- [23] S. Benzekry, G. Chapisat, J. Ciccolini, A. Erlinger, F. Hubert, A new mathematical model for optimizing the combination between antiangiogenic and cytotoxic drugs in oncology, *Comptes Rendus Mathematique* 350 (2012) 23–28.
- [24] C. Letellier, S. K. Sasmal, C. Draghi, F. Denis, D. Ghosh, A chemotherapy combined with an anti-angiogenic drug applied to a cancer model including angiogenesis, *Chaos, Solitons & Fractals* 99 (2017) 297–311.
- [25] A. St`ephanou, A. Lesart, J. Deverch`ere, A. Juhem, A. Popov, F. Est`eve, How tumour-induced vascular changes alter angiogenesis: Insights from a computational model, *Journal of Theoretical Biology* 419 (2017) 211–226.
- [26] M. Wu, H. B. Frieboes, S. R. McDougall, M. A. Chaplain, V. Cristini, J. Lowengrub, The effect of interstitial pressure on tumor growth: coupling with the blood and lymphatic vascular systems, *Journal of theoretical biology* 320 (2013) 131–151.
- [27] J. Alfonso, A. K`ohn-Luque, T. Stylianopoulos, F. Feuerhake, A. Deutsch, H. Hatzikirou, Why one-size-fits-all vaso-modulatory interventions fail to control glioma invasion: in silico insights, *Scientific reports* 6 (2016).

- [28] B. Szomolay, T. D. Eubank, R. D. Roberts, C. B. Marsh, A. Friedman, Modeling the inhibition of breast cancer growth by gm-csf, *Journal of theoretical biology* 303 (2012) 141–151.
- [29] K. R. Swanson, R. C. Rockne, J. Claridge, M. A. Chaplain, E. C. Alvord, A. R. Anderson, Quantifying the role of angiogenesis in malignant progression of gliomas: in silico modeling integrates imaging and histology, *Cancer research* 71 (2011) 7366–7375.
- [30] A. Kolobov, M. Kuznetsov, Investigation of the effects of angiogenesis on tumor growth using a mathematical model, *Biophysics* 60 (2015) 449–456.
- [31] M. B. Kuznetsov, A. V. Kolobov, Mathematical modelling of chemotherapy combined with bevacizumab, *Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling* 32 (2017) 293–304.
- [32] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson, Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science* 324 (2009) 1029–1033.
- [33] O. Pyaskovskaya, D. Kolesnik, A. Kolobov, S. Vovyanko, G. Solyanik, Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture, *Exp. Oncol* 30 (2008) 269–275.
- [34] A. Kolobov, A. Polezhaev, G. Solyanik, The role of cell motility in metastatic cell dominance phenomenon: analysis by a mathematical model, *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 3 (2000) 63–77.
- [35] A. Giese, R. Bjerkvig, M. Berens, M. Westphal, Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment, *Journal of clinical oncology* 21 (2003) 1624–1636.
- [36] M. J. Eymontt, G. Gwinup, F. A. Kruger, D. E. Maynard, G. J. Hamwi, Cushing's syndrome with hypoglycemia caused by adrenocortical carcinoma, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 25 (1965) 46–52.
- [37] A. Carreau, B. E. Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon, C. Kieda, Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? small molecules and hypoxia, *Journal of cellular and molecular medicine* 15 (2011) 1239–1253.

- [38] M. Kuznetsov, N. Gorodnova, S. Simakov, A. Kolobov, Multiscale modeling of angiogenic tumor growth, progression, and therapy, *Biophysics* 61 (2016) 1042–1051.
- [39] R. N. Pittman, Regulation of tissue oxygenation, in: *Colloquium series on integrated systems physiology: from molecule to function*, volume 3, Morgan & Claypool Life Sciences, 2011, pp. 1–100.
- [40] W. Brown, A. Hill, The oxygen-dissociation curve of blood, and its thermodynamical basis, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 94 (1923) 297–334.
- [41] D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *cell* 144 (2011) 646–674.
- [42] G. C. Gaitanos, C. Williams, L. H. Boobis, S. Brooks, Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise, *Journal of applied physiology* 75 (1993) 712–719.
- [43] O. Warburg, F. Wind, E. Negelein, The metabolism of tumors in the body, *The Journal of general physiology* 8 (1927) 519.
- [44] X. L. Zu, M. Guppy, Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction, *Biochemical and biophysical research communications* 313 (2004) 459–465.
- [45] V. Gogvadze, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells, *Molecular aspects of medicine* 31 (2010) 60–74.
- [46] D. C. Wallace, Mitochondria and cancer, *Nature reviews. Cancer* 12 (2012) 685.
- [47] V. R. Fantin, J. St-Pierre, P. Leder, Attenuation of *ldh-a* expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance, *Cancer cell* 9 (2006) 425–434.
- [48] H. R. Christofk, M. G. Vander Heiden, M. H. Harris, A. Ramanathan, R. E. Gerszten, R. Wei, M. D. Fleming, S. L. Schreiber, L. C. Cantley, The m2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth, *Nature* 452 (2008) 230.

- [49] S. Gottschalk, N. Anderson, C. Hainz, S. G. Eckhardt, N. J. Serkova, Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia bcr-abl-positive cells, *Clinical Cancer Research* 10 (2004) 6661–6668.
- [50] L. M. Phan, S.-C. J. Yeung, M.-H. Lee, Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies, *Cancer biology & medicine* 11 (2014)
- [51] L. Pan, P. Beverley, P. Isaacson, Lactate dehydrogenase (ldh) isoenzymes and proliferative activity of lymphoid cells: an immunocytochemical study, *Clinical & Experimental Immunology* 86 (1991) 240–245.
- [52] H. Schmidt, W. Siems, M. Müller, R. Dumdey, S. M. Rapoport, ATP producing and consuming processes of Ehrlich mouse ascites tumor cells in proliferating and resting phases, *Experimental Cell Research* 194 (1991) 122–127.
- [53] R. Mathew, V. Karantza-Wadsworth, E. White, Role of autophagy in cancer, *Nature Reviews. Cancer* 7 (2007) 961.
- [54] P. Sonveaux, F. Végran, T. Schroeder, M. C. Wergin, J. Verrax, Z. N. Rabbani, C. J. De Saedeleer, K. M. Kennedy, C. Diepart, B. F. Jordan, et al., Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice, *The Journal of Clinical Investigation* 118 (2008) 3930.
- [55] R. Moreno-Sánchez, S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández, E. Saavedra, Energy metabolism in tumor cells, *The FEBS Journal* 274 (2007) 1393–1418.
- [56] J. Freyer, R. Sutherland, A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/RO spheroids during growth, *Journal of Cellular Physiology* 124 (1985) 516–524.
- [57] J. C. Betts, P. T. Lukey, L. C. Robb, R. A. McAdam, K. Duncan, Evaluation of a nutrient starvation model of mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling, *Molecular Microbiology* 43 (2002) 717–731.
- [58] K. Izuishi, K. Kato, T. Ogura, T. Kinoshita, H. Esumi, Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy, *Cancer Research* 60 (2000) 6201–6207.

- [59] D. Shweiki, M. Neeman, A. Itin, E. Keshet, Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (1995) 768–772.
- [60] F. Mac Gabhann, A. S. Popel, Interactions of vegf isoforms with vegfr1, vegfr-2, and neuropilin in vivo: a computational model of human skeletal muscle, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 292 (2007) H459–H474.
- [61] S. Ugurel, G. Rappl, W. Tilgen, U. Reinhold, Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival, *Journal of clinical oncology* 19(2001) 577–583.
- [62] A. D. Association, et al., Screening for type 2 diabetes, *Diabetes care* 27 (2004) s11–s14.
- [63] P. G. Baker, R. Mottram, Metabolism of exercising and resting human skeletal muscle, in the post-prandial and fasting states, *Clinical science* 44 (1973) 479–491.
- [64] J. Casciari, S. Sotirchos, R. Sutherland, Mathematical modelling of microenvironment and growth in emt6/ro multicellular tumour spheroids, *Cell proliferation* 25 (1992) 1–22.
- [65] V. Tuchin, A. Bashkatov, E. Genina, Y. P. Sinichkin, N. Lakodina, In vivo investigation of the immersion-liquid-induced human skin clearing dynamics, *Technical Physics Letters* 27 (2001) 489–490.
- [66] T. Clerbaux, P. Gustin, B. Detry, M. Cao, A. Frans, Comparative study of the oxyhaemoglobin dissociation curve of four mammals: man, dog, horse and cattle, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 106 (1993) 687–694.
- [67] C. Androjna, J. E. Gatica, J. M. Belovich, K. A. Derwin, Oxygen diffusion through natural extracellular matrices: implications for estimating critical thickness values in tendon tissue engineering, *Tissue Engineering Part A* 14 (2008) 559–569.
- [68] J. M. Kelm, C. D. Sanchez-Bustamante, E. Ehler, S. P. Hoerstrup, V. Djonov, L. Ittner, M. Fussenegger, Vegf profiling and angiogenesis in human microtissues, *Journal of biotechnology* 118 (2005) 213–229.

- [69] A. Köhn-Luque, W. De Back, Y. Yamaguchi, K. Yoshimura, M. Herrero, T. Miura, Dynamics of vegf matrix-retention in vascular network patterning, *Physical biology* 10 (2013) 066007.
- [70] N. Papadopoulos, J. Martin, Q. Ruan, A. Rafique, M. P. Rosconi, E. Shi, E. A. Pyles, G. D. Yancopoulos, N. Stahl, S. J. Wiegand, Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (vegf) and related ligands by vegf trap, ranibizumab and bevacizumab, *Angiogenesis* 15(2012) 171–185.
- [71] I. Genentech, Highlights of prescribing information, 2017. URL: https://www.gene.com/download/pdf/avastin_prescribing.pdf.
- [72] E. Marx, W. Mueller-Klieser, P. Vaupel, Lactate-induced inhibition of tumor cell proliferation, *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 14 (1988) 947–955.
- [73] P. V. Dickson, J. B. Hamner, T. L. Sims, C. H. Fraga, C. Y. Ng, S. Rajasekeran, N. L. Hagedorn, M. B. McCarville, C. F. Stewart, A. M. Davidoff, Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy, *Clinical cancer research* 13(2007) 3942–3950.
- [74] S. K. Stamatelos, E. Kim, A. P. Pathak, A. S. Popel, A bioimage informatics based reconstruction of breast tumor microvasculature with computational blood flow predictions, *Microvascular research* 91 (2014) 8–21.
- [75] R. S. Richardson, S. Duteil, C. Wary, D. W. Wray, J. Hoff, P. G. Carlier, Human skeletal muscle intracellular oxygenation: the impact of ambient oxygen availability, *The Journal of physiology* 571 (2006) 415–424.
- [76] J. P. Boris, D. L. Book, Flux-corrected transport. i. shasta, a fluid transport algorithm that works, *Journal of computational physics* 11 (1973) 38–69
- [77] W. H. Press, Numerical recipes 3rd edition: The art of scientific computing, Cambridge university press, 2007.
- [78] N. Tanigawa, M. Matsumura, H. Amaya, A. Kitaoka, T. Shimomatsuya, C. Lu, R. Muraoka, T. Tanaka, Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer* 79 (1997) 220–225.

- [79] J. Ma, D. J. Waxman, Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment, *Molecular cancer therapeutics* 7 (2008) 3670–3684.
- [80] E. M. Renkin, Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes, *The Journal of general physiology* 38 (1954) 225–243.
- [81] J. Pappenheimer, E. Renkin, L. Borrero, Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes, *American Journal of Physiology–Legacy Content* 167 (1951) 13–46.
- [82] G. Clough, L. Smaje, Exchange area and surface properties of the microvasculature of the rabbit submandibular gland following duct ligation., *The Journal of physiology* 354 (1984) 445–456.
- [83] A. Bouchoux, H. Roux-de Balman, F. Lutin, Nanofiltration of glucose and sodium lactate solutions: Variations of retention between single and mixed-solute solutions, *Journal of membrane science* 258 (2005) 123–132.
- [84] L. M. Hirvonen, G. O. Fruhwirth, N. Srikantha, M. J. Barber, J. E. Neffendorf, K. Suhling, T. L. Jackson, Hydrodynamic radii of ranibizumab, aflibercept and bevacizumab measured by time-resolved phosphorescence anisotropy, *Pharmaceutical research* 33 (2016) 2025.
- [85] D. Venturoli, B. Rippe, Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability, *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 288 (2005) F605–F613.
- [86] P. Carmeliet, VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer, *Oncology* 69 (2005) 4–10.
- [87] F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D. A. Berk, V. P. Torchilin, R. K. Jain, Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size, *Cancer research* 55 (1995) 3752–3756.

Приложение А

Вывод уравнения для поля конвективной скорости

Рассмотрим систему уравнений для субпопуляций клеток i , которые могут делиться, гибнуть, трансформироваться друг в друга и обладать собственной подвижностью, причем суммарная плотность клеток постоянна и равна единице. Для простоты объемы всех клеток равны. Эволюция системы описывается уравнениями:

$$\frac{\partial n_i}{\partial t} = f_i(\mathbf{n}, \cdot) + D_i \Delta n_i - \nabla \cdot (\mathbf{I} n_i).$$

Здесь $f_i(\mathbf{n}, \cdot)$ – функции, которые описывают локальную кинетику клеточных популяций, которые зависят от плотностей самих клеток и от внешних условий; D_i – коэффициент диффузии ячеек i -ой популяции. Градиент \mathbf{I} может быть выведен путем суммирования левой и правой частей уравнений следующим образом:

$$\nabla \cdot \mathbf{I} = \sum_i [f_i(\mathbf{n}, \cdot) + D_i \Delta n_i]$$

что в случае рассматриваемой здесь модели принимает следующий вид:

$$\nabla \cdot \mathbf{I} = B n_1 + D_n \Delta n_2.$$

при этом члены клеточных переходов ячеек взаимно аннулируются.

Приложение Б

Оценка проницаемостей

Обмен жиронерастворимых веществ с некрупными молекулами (например, глюкозы) между кровью и межклеточной жидкостью в ткани происходит главным образом из-за пассивной диффузии через капиллярные поры. Этот процесс может быть описан законом Фика, который принимает следующую форму для движения через одну пору, которая считается цилиндрической и перпендикулярной к поверхности капилляра:

$$Q = D \cdot A \frac{C_{cap} - C_{tis}}{h},$$

где Q – приток рассматриваемого вещества, D – коэффициент его диффузии внутри поры, $C_{cap} - C_{tis}$ – разность концентраций вещества в капиллярной крови и межклеточной жидкости, h – длина поры, а A – часть площади поверхности поры, доступная для перемещения молекул вещества через нее. Поскольку молекула испытывает эффект, называемый стерическим исключением, что означает, что она не может приблизиться к краю поры ближе, чем длина ее гидродинамического радиуса, эта площадь равна:

$$A = A(a, r) = \pi(r^2 - a^2),$$

где a – гидродинамический радиус молекулы вещества, r – радиус поры. Для рассмотрения капиллярной сети в целом удобно ввести физически измеримый параметр ее проницаемости P , который определяется следующим образом:

$$P = \frac{D \cdot A_p}{S_h}$$

где A_p – сумма площадей пор в рассматриваемом объеме, доступных для движения молекул через стенку капилляра, S_h – площадь поверхности капилляров в рассматриваемом объеме. Это определение приводит к виду уравнения для притока веществ, часто используемому в данной работе:

$$Q = PS(C_{cap} - C_{tts})$$

Мы рассматриваем существующую микроциркуляторную сеть как состоящую из сплошных капилляров, которые являются самым распространенным и наименее проницаемым типом капилляров в теле человека. Перенос растворенных в крови веществ в их случае происходит главным образом через относительно небольшие соединения эндотелиальных клеток, в то время как капилляры, образованные в результате опухолевого ангиогенеза, обладают гораздо большими отверстиями в их стенках, называемыми фенестрациями [21]. Диффузия веществ ограничена порами из-за дополнительного гидродинамического сопротивления, которое может быть количественно оценено с использованием следующего эмпирически полученного уравнения Ренкина [80]:

$$D^* = D^*(D, a, r) = D \cdot \left(1 - 2,1 \frac{a}{r} + 2,09 \left(\frac{a}{r} \right)^2 - 0,95 \left(\frac{a}{r} \right)^3 \right)$$

где D – коэффициент свободной диффузии вещества. Оригинальное уравнение Ренкина также включает в себя стерическое исключение, которое было выписано выше в явном виде.

Реальные поры, очевидно, не являются идеальными цилиндрами, однако было оценено, что поры в скелетной и сердечной мышцах ограничивают диффузию в той же степени, как это бы делали цилиндрические поры с радиусом 4-5нм [81], поэтому мы принимаем радиусы пор нормальных капилляров NC

равными 5нм. Также мы предполагаем, что при нормализации и денормализации капилляров, т.е. перехода из NC в AC и обратно, площадь поверхности капилляров, ширина их стенок и количество пор остаются постоянными, а радиусы всех пор меняются одинаково. Этот подход позволяет, имея значение проницаемости P_1 в случае свободной диффузии D_1 , радиусов пор r_1 и радиусов молекул a_1 , получить значение проницаемости P_2 при значениях параметров D_2, r_2, a_2 :

$$\frac{P_2(D_2, r_2, a_2)}{P_1(D_1, r_1, a_1)} = \frac{D'_2(D_2, r_2, a_2)A[(a_2, r_2)]}{D'_1(D_1, r_1, a_1)A[(a_1, r_1)]}$$

Проницаемость сплошных капилляров для глюкозы оценивалась в экспериментах и примерно равна $P_{G,NC} = 1,1 \cdot 10^{-5}$ см/с [82]. Гидродинамический радиус глюкозы составляет 0,36 нм [83], бевацизумаба – 4,58нм [84]. Коэффициент диффузии бевацизумаба оценен в предположении обратной пропорциональности между коэффициентом диффузии вещества и радиусом его молекулы, с использованием соответствующих значения для VEGF как контрольных. Это приводит к величине проницаемости нормальных капилляров для бевацизумаба $P_{A,NC} = 1,1 \cdot 10^{-9}$ см/с. Гидродинамический радиус VEGF оценен в 3нм с использованием формулы $r = 0,0483 \cdot M^{0,386}$ [85], где – его молекулярная масса, выраженная в дальтонах, которая приблизительно равна $4.5 \cdot 10^4$ [86], поэтому значение проницаемости нормальных капилляров для него равно $P_{V,NC} = 6,4 \cdot 10^{-8}$ см/с. Стоит отметить, что для больших молекул, таких как бевацизумаб, конвективная часть транваскулярного переноса через небольшие поры является относительно более важной, чем в случае малых молекул и/или больших пор, но мы просто пренебрегаем этим фактом ради простоты, так как учет конвективной части притока практически не влияет на результаты работы. Чтобы получить значения проницаемости ангиогенных капилляров для моделируемых веществ, необходимо выбрать значение радиусов их пор, которое мы

выбираем равным 7,5 нм. Таким образом, $P_{A,AC} = 8,8 \cdot 10^{-8}$ см/с, $P_{V,AC} = 7,8 \cdot 10^{-7}$ см/с, оба значения хорошо согласуются с экспериментально измеренными проницаемостями опухолевых капилляров для различных веществ с разными размерами молекул [87]. Проницаемость ангиогенных капилляров для глюкозы в этом случае равна $P_{G,AC} = 2,8 \cdot 10^{-5}$ см/с.