

POLITECNICO DI MILANO

---

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi  
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Matematica

Un Modello Matematico  
per la Simulazione della Crescita  
di Biomassa in Ingegneria dei Tessuti

Relatore: Prof. Riccardo Sacco  
Correlatore: Dr. Ing. Paola Causin

Laureando: Davide Colombo  
Matricola: 682344

Anno Accademico 2009-2010

# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>2</b>
<b>1 I Bioreattori nell'Ingegneria dei Tessuti</b>	<b>5</b>
1.1 Seminazione cellulare di scaffold 3D . . . . .	6
1.2 Incremento del trasporto di massa . . . . .	9
1.3 Condizionamento meccanico . . . . .	12
1.4 Quadro sintetico dei fenomeni in un bioreattore . . . . .	14
<b>2 Il Modello Matematico</b>	<b>17</b>
2.1 Il processo di media volumetrica . . . . .	17
2.2 Le equazioni macroscopiche mediate . . . . .	21
2.2.1 Il modello fluido . . . . .	22
2.2.2 Il modello per il nutriente . . . . .	27
2.2.3 Il modello per le cellule . . . . .	30
2.3 Le condizioni al bordo e iniziali . . . . .	31
2.4 L'Adimensionalizzazione delle equazioni . . . . .	32
<b>3 Il Modello Numerico</b>	<b>37</b>
3.1 L'approssimazione numerica . . . . .	37
<b>4 Simulazioni numeriche</b>	<b>41</b>
4.1 La validazione del codice numerico . . . . .	41
4.2 Analisi di sensitività . . . . .	46
<b>Conclusioni</b>	<b>56</b>

# Introduzione

Nel presente lavoro di tesi vogliamo affrontare lo studio di un modello matematico per la simulazione della crescita di cellule all'interno di un bioreattore soggetto a perfusione dinamica. Tale problema si incontra nelle moderne applicazioni di Ingegneria dei Tessuti, specificatamente nella rigenerazione *in vitro* di cartilagini articolari.

Nella prima parte della tesi descriviamo il bioreattore, i suoi utilizzi, i fenomeni fisici che avvengono al suo interno e le diverse tipologie di dispositivo presenti in letteratura, evidenziandone le differenze in termini di efficienza. Un bioreattore è essenzialmente un dispositivo controllato al cui interno vengono prima seminate e quindi coltivate vari tipi di cellule. Tale dispositivo è costituito da una matrice porosa su cui attecchiscono le cellule. All'interno dei pori, oltre alle cellule, trova spazio anche un fluido che ha il compito di nutrire le cellule (Figura 1). La crescita cellulare è collegata a doppio filo con la quantità di nutriente presente nel fluido e col tipo di moto che il fluido possiede. Infatti, più alta sarà la concentrazione di nutriente disponibile per le cellule e maggiore sarà la loro crescita. Volendo ottenere una coltura uniforme all'interno di tutto il costruito cellulare sarà necessario che il fluido nutriente riesca ad invadere ogni poro della matrice. D'altro canto la crescita cellulare andrà a riempire i vuoti presenti nella matrice e ciò causerà una diminuzione del flusso del fluido nutriente. Inoltre le cellule possiedono meccanismi di inibizione della crescita quando vengono in contatto tra

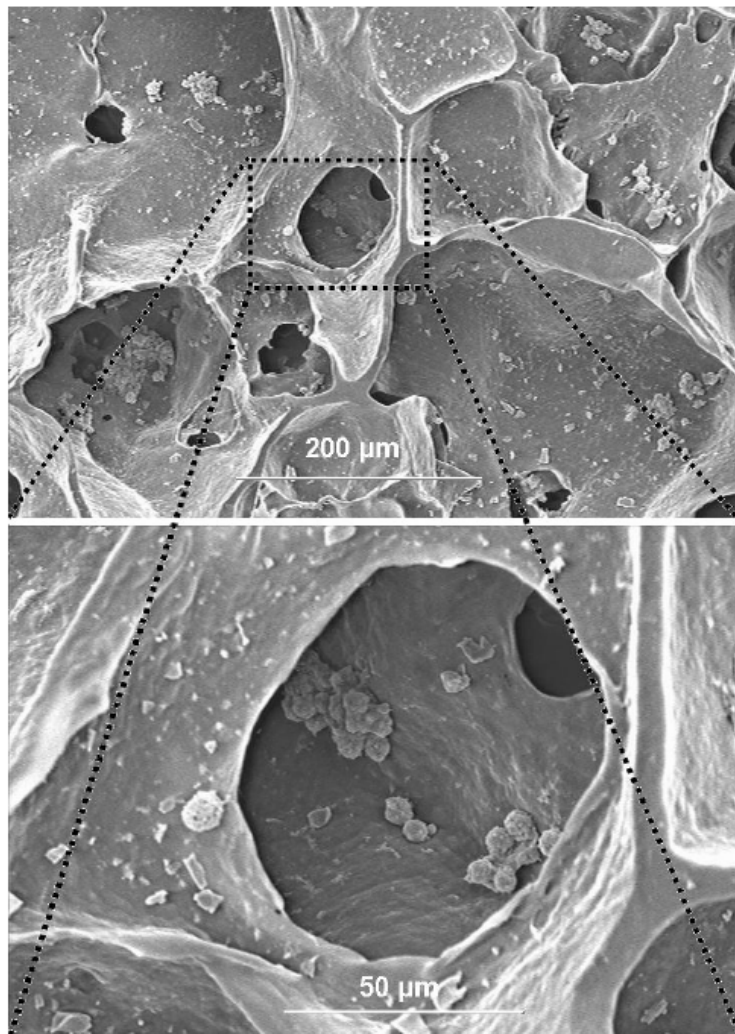


Figura 1: Immagine da un microscopio a scansione elettronica di una matrice porosa seminata con condrociti delle articolazioni umane [1].

di loro; questo fenomeno, insieme al fatto che le cellule hanno un tempo di vita limitato, è un fattore di cui tenere conto all'interno della costruzione del modello matematico.

Nella seconda parte della tesi andremo a costruire il modello matematico che governa il bioreattore a perfusione dinamica. Particolare attenzione verrà posta nella descrizione matematica del passaggio dalla descrizione microscopica

pica del bioreattore a quella macroscopica oggetto di questa tesi mediante la cosiddetta tecnica del *Volume Averaging* (media volumetrica). Quello che infatti ci proponiamo di studiare non è il modello al dettaglio della singola cellula ma al livello dell'intero costruito cellulare. Se a livello microscopico abbiamo tre fasi (cellule, fluido nutriente e matrice porosa), al livello macroscopico vogliamo ottenere delle equazioni che descrivono l'evoluzione delle cellule, del nutriente e del moto del fluido nella loro globalità. Sarà proprio il metodo di media volumetrica a rendere possibile tale passaggio. Otterremo quindi tre sistemi di equazioni fortemente accoppiati. Tali sottoproblemi verranno adimensionalizzati per determinare quali fenomeni sono più importanti, onde successivamente poter semplificare il modello globale.

Nella terza ed ultima parte illustriamo il modello numerico utilizzato e le relative simulazioni per la sua validazione. Dato il forte accoppiamento delle equazioni che costituiscono il modello matematico in esame, utilizzeremo un algoritmo iterativo chiamato *metodo di Gauss-Seidel a blocchi*. Tale metodo di punto fisso ci permetterà di risolvere in successione i tre problemi precedentemente descritti attraverso schen numerici agli elementi finiti. Dato che si stanno studiando grandezze fisiche come la concentrazione, particolare attenzione si porrà nell'utilizzare metodi numerici che preservino la positività della soluzione. Inoltre essendo in presenza di equazioni di diffusione e trasporto, la stabilità degli schemi numerici verrà attentamente controllata. Le prime simulazioni proposte hanno lo scopo di validare il codice rispetto a risultati noti in letteratura. Ulteriori test sono rivolti allo studio di sensitività del modello computazionale proposto nella tesi rispetto al variare della porosità dello scaffold, che è un'importante parametro tecnologico in questo tipo di applicazioni.

# Capitolo 1

## I Bioreattori nell'Ingegneria dei Tessuti

I bioreattori sono dispositivi nei quali si sviluppano processi biologici e/o biochimici sotto condizioni altamente controllate e monitorate. L'alto grado di riproducibilità, controllo e automazione introdotti dai bioreattori per specifici bioprocessi sperimentali sono stati la chiave per il loro trasferimento alle applicazioni su larga scala. I bioreattori sono di solito utilizzati nei processi di fermentazione industriale, trattamento delle acque sporche, processi alimentari e produzione di proteine farmaceutiche e ricombinanti (come, ad esempio, anticorpi, fattori di crescita, vaccini e antibiotici). L'Ingegneria dei Tessuti è la disciplina che applica e integra i principi e metodi dell'ingegneria alle scienze della vita per lo sviluppo di sostituti biologici per riparare, mantenere o migliorare le funzioni dei tessuti organici [2]. In un tipico approccio, strutture tessutali 3D vengono generate dall'associazione di cellule (autologhe o allogeniche) all'interno di opportune matrici porose (dette *scaffold*), che forniscono la struttura per lo sviluppo dei tessuti e si degradano, o vengono riassorbite ad un tasso definito. La coltura *in vitro* di costrutti scaffold-cellule tridimensionali sotto condizioni che supportano un'efficiente nutrimento per le cellule, possibilmente combinato con l'applicazione di forze

meccaniche che direzionano l'attività cellulare e il fenotipo, è un importante passo verso lo sviluppo di innesti funzionali per il trattamento di parti del corpo mancanti o danneggiate (Ingegneria dei Tessuti funzionale [3]). L'obiettivo ultimo dell'ingegnerizzazione di tessuti tridimensionali *in vitro* non è sempre la generazione di innesti ma può anche essere la costruzione di strutture non impiantabili che vengono utilizzate come un dispositivo di supporto esterno di un organo per cui un donatore non è disponibile [4]. Inoltre, l'Ingegneria dei Tessuti può fornire modelli affidabili che facilitano la comprensione delle relazioni tra funzioni e strutture in condizioni normali e patologiche, con possibili applicazioni commerciali in terapie molecolari [5]. La generazione di tessuti 3D *ex vivo* non solo richiede lo sviluppo di nuovi modelli biologici ma pone nuove sfide tecnologiche a causa dei requisiti fisico-chimici delle grandi masse di cellule. In questa prima parte di tesi vedremo il ruolo dei bioreattori nei processi chiave per l'ingegnerizzazione *ex vivo* di tessuti 3D basati su cellule e scaffold, includendo il processo di seminazione delle cellule negli scaffold porosi, il nutrimento delle cellule nel costrutto risultante e gli stimoli meccanici per lo sviluppo dei tessuti.

## 1.1 Seminazione cellulare di scaffold 3D

La seminazione cellulare degli scaffold, che è la disseminazione di singole cellule all'interno dello scaffold, è il primo passo per iniziare una coltura tridimensionale e può giocare un ruolo cruciale nella formazione del tessuto [6]. La semina di cellule ad alta densità è stata associata con una migliore formazione di tessuto nel costrutto 3D, con un più alto tasso di produzione di cartilagine di matrice [7], con un incremento della mineralizzazione ossea [8] e con un miglioramento della struttura dei tessuti cardiaci [9]. Perciò, innesti autologhi ingegnerizzati per applicazioni cliniche che usano un'alta densità di cellule iniziale richiedono che le cellule vengano seminate con la maggior

efficienza possibile. Inoltre, la distribuzione iniziale di cellule all'interno dello scaffold dopo la semina è stata messa in relazione con la distribuzione del tessuto che si genera all'interno del costruito [8, 10–12], suggerendo che una semina di cellule uniforme può stabilire le basi migliori per una generazione di tessuti uniformi. Purtroppo, anche quando si ha a che fare con scaffold di piccole dimensioni (per esempio 5mm di diametro per 2mm di altezza), può essere molto impegnativo ottenere una distribuzione ad alta densità di cellule efficienti e uniformemente distribuite nel volume dello scaffold. Nonostante il caricamento statico delle cellule nello scaffold sia il metodo di semina più utilizzato, diversi studi [8, 12–15] riportano la bassa efficienza di tale metodo insieme ad una non-uniformità nella distribuzione di cellule [8, 12, 14, 16–21], dovuta, in parte, alla natura manuale del processo. Un'efficienza e una uniformità decisamente più alte si sono riscontrate quando le cellule vengono seminate su maglie di poli(acido glicolico) non tessuto in bioreattori di tipo stirred-flask [19]. La miscelazione delle cellule in sospensione attorno allo scaffold che è sospeso all'imbocco della fiasca, trasporta le cellule negli scaffold per convezione (Figura 1.1a). Tuttavia, a causa della difficoltà nel realizzare un'adeguata convezione delle cellule verso le zone più interne dello scaffold, questo tipo di semina può presentare una bassa efficienza e una distribuzione non uniforme [16, 20], con un'alta densità di cellule che rimangono confinate sulla superficie dello scaffold [6]. Sfruttando il principio del trasporto convettivo per la semina dello scaffold, un flusso di cellule sospese nel fluido che vada ad inserirsi direttamente tra i pori dello scaffold produce una distribuzione di cellule più uniforme in confronto a quella ottenuta attraverso una semina statica [14]. Quando la perfusione diretta viene incorporata all'interno di un bioreattore automatizzato, si ottiene una più alta efficienza di semina e una migliore distribuzione di cellule, specialmente se comparata con le semine statiche o attraverso il bioreattore di tipo stirred-flask [20]. Vari tipi di scaffold possono essere facilmente seminati attraverso un processo automatizzato e controllato utilizzando i precedenti concetti e un bioreattore semplicemente progettato. Inoltre, la semina per perfusione può



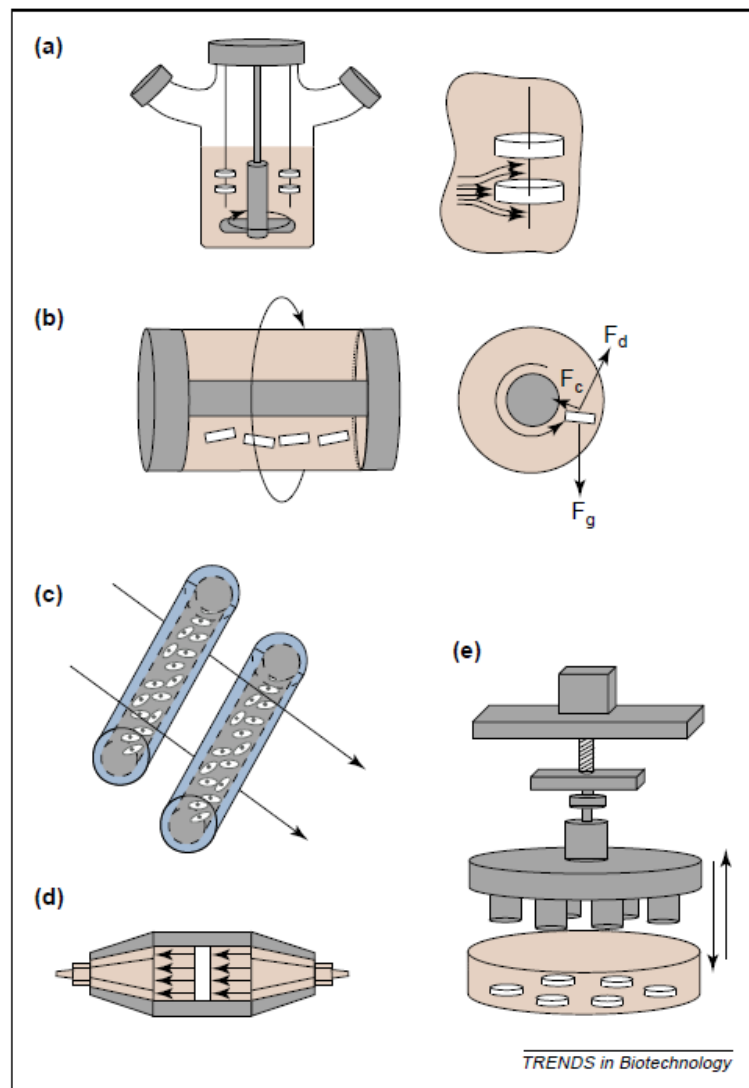


Figura 1.1: Principali tipi di bioreattori per le applicazioni di Ingegneria dei Tessuti.

essere facilmente integrata all'interno di un bioreattore a perfusione capace di gestire sia la fase di semina che la fase di coltura vera e propria. Questi bioreattori di semina e coltura sono stati progettati per gli innesti vascolari ingegnerizzati [22] e sono stati anche utilizzati per le cartilagini [23] e i tessuti cardiaci [24] e per il mantenimento delle funzioni degli epatociti all'interno di scaffold 3D [25]. Questi sistemi non solo razionalizzano i pro-

cessi ingegnerizzati ma riducono anche i rischi associati al trasferimento del costrutto cellulare tra bioreattori separati.

## 1.2 Incremento del trasporto di massa

È ben noto che il rifornimento di ossigeno e nutrienti è un fattore critico limitante per le colture *in vitro* di tessuti 3D. Di conseguenza, le cellule sferiche più grandi di 1mm di diametro contengono generalmente al loro interno un nucleo necrotico ipossico circondato da un cerchio di cellule attive [26]. Osservazioni analoghe vengono riportate per differenti tipi di colture cellulari in scaffold a funzionamento statico. Per esempio, la deposizione di glicosaminoglicani (GAG) da parte dei condrociti coltivati su una mesh poli (acido glicolico) è povera nella parte centrale del costrutto ( $\sim 400 \mu m$  dalla superficie esterna) [27] (Figura 1.2a), e la deposizione di matrice mineralizza-

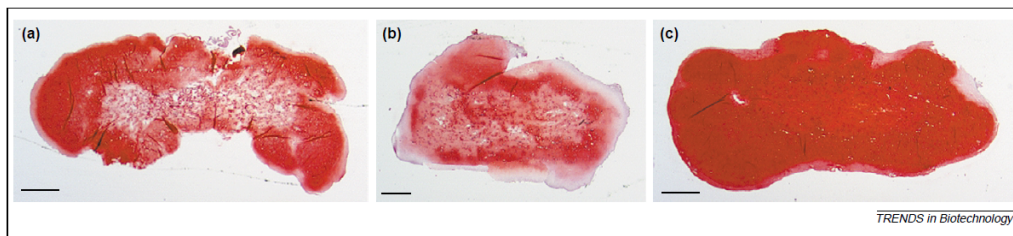


Figura 1.2: Sezioni di tessuti ingegnerizzati dopo sei settimane di coltura in diverse condizioni idrodinamiche.

ta a causa di osteoblasti stromali coltivati all'interno di schiume poli (acido DL-lattico-glicolico) raggiunge una profondità massima di penetrazione di  $240 \mu m$  dalla superficie [28]. Dato che i costrutti ingegnerizzati devono avere almeno qualche millimetro di grandezza per poter essere utilizzati come innesti per tessuti di rimpiazzo, i limiti del trasferimento di massa rappresentano un serio ostacolo ad una efficiente crescita del costrutto tessutale. Le limitazioni di trasferimento di massa esterne possono essere ridotte usando

costrutti cellulari in un bioreattore di tipo stirred-flask (Figura 1.1a). Nella sua configurazione di base, il tipo stirred-flask induce un mix di ossigeno e nutrienti attraverso il mezzo nutriente e riduce la concentrazione di strati al bordo sulla superficie del costrutto. La coltura di condrociti bovini su una mesh poli (acido glicolico) non tessuto in un bioreattore di tipo stirred-flask induce un incremento sia della sintesi del GAG [29] che della frazione di GAG accumulata all'interno della parte centrale del costrutto [27]. Comunque, la frazione netta media di GAG accumulata attraverso il costrutto viene ridotta e ad una profondità di  $400 \mu m$  capsule fibrose vengono formate sulla superficie del costrutto (Figura 1.2b) [27]. Ciò è probabilmente causato dai vortici turbolenti generati all'interno del bioreattore stirred-flask, il quale incrementa il tasso di GAG rilasciato nel mezzo di coltura e vengono associati con la de-differenziazione dei condrociti. Un flusso dinamico laminare generato da un ambiente fluido rotante costituisce un'alternativa ed un modo efficiente di ridurre le limitazioni legate alla diffusione del nutriente mentre produce un basso livello di sforzi. L'efficienza dei bioreattori il cui recipiente ha un parete rotante (rotating wall vessel - RWV) (Figura 1.1b) per la generazione di tessuti equivalenti è stata dimostrata usando condrociti [30], cellule cardiache [9] e varie cellule tumorali [31, 32]. Dopo poche settimane di coltivazione all'interno di tale bioreattore, il costrutto cartilagineo mostra proprietà biochimiche e biomeccaniche superiori a quelle delle colture statiche o del bioreattore stirred-flask ed approssima quelle della cartilagine originaria [30] (Figura 1.2c) [33], dove il costrutto del tessuto cardiaco consiste in cellule allungate che si contraggono spontaneamente e in modo sincrono. Le cellule derivanti dal cancro alla prostata [31] e del melanoma [32] che vengono coltivate in questi bioreattori hanno una struttura 3D che riflette l'architettura cellulare e la composizione eterogenea del tumore posto *in vivo*. Sulla base di questi studi, questo tipo di bioreattore è stato proposto quale supporto per lo sviluppo *in vitro* di tessuti ingegnerizzati [34]. In particolare, le colture cellulari 3D in questi bioreattori vengono utilizzate per identificare e controllare diversi fattori biochimici che influenzano le funzioni

delle cellule, la crescita cellulare e la loro capacità di integrazione [35], così come lo studio delle instabilità fenotipica, resistenza alle radiazioni e la risposta delle cellule del cancro ai farmaci [34]. I bioreattori la cui perfusione avviene sia attraverso che attorno fibre cave semi-permeabili sono stati usati con successo per mantenere le funzioni di cellule altamente metaboliche (per esempio gli ematociti) incrementando il trasporto di massa dei nutrienti e dell'ossigeno (Figura 1.1c). Questo concetto è stato esteso all'Ingegneria dei Tessuti attraverso la coltura perfusiva direttamente attraverso i pori dello scaffold, in modo da ridurre le limitazioni del trasporto di massa sia alla periferia del costrutto cellulare che all'interno dei suoi pori (Figura 1.1d). I bioreattori a perfusione diretta hanno mostrato di migliorare: (i) la crescita, differenziazione e mineralizzazione dei depositi di matrice per le cellule ossee [36, 37], (ii) la proliferazione dei cheratinociti umani orali [38], (iii) il tasso di sintesi dell'albumina da parte degli ematociti [25], (iv) la presenza di indicatori cardiaci specifici da parte dei cardiomiociti [39] e (v) l'accumulo e sintesi del GAG da parte dei condrociti [23, 40]. Quando incorporata nel progetto di un bioreattore, la perfusione diretta può quindi essere usata come un utile strumento per migliorare la sopravvivenza delle cellule, la loro crescita e lo sviluppo delle loro funzioni. D'altro canto, gli effetti della perfusione sono fortemente dipendenti dal tasso di perfusione e dallo stadio di maturazione del costrutto, come dimostrato dalle colture 3D di condrociti [23]. Quindi, l'ottimizzazione di un bioreattore a perfusione richiede un bilancio tra il trasporto di massa dei nutrienti e la produzione degli scarti da e verso le cellule, la ritenzione di nuovi componenti della matrice extracellulare sintetizzati e con gli sforzi indotti dal fluido all'interno dei pori. La configurazione ottimale di flusso per un bioreattore, di solito ottenuta attraverso un approccio *trial-and-error*, può essere vantaggiosamente supportata da metodi di simulazione. Pacchetti software per la fluidodinamica computazionale sono un valido strumento per il calcolo dei campi di moto, degli sforzi e del trasporto di massa in un costrutto tridimensionale. Modelli fluidodinamici sono stati utilizzati per il calcolo del momento e del trasporto di massa dell'ossigeno in

un bioreattore cilindrico concentrico [41]. Un modello CFD per la perfusione diretta ha dimostrato che una distribuzione casuale di fibre porta ad una distribuzione degli sforzi molto variabile: uno scaffold con una distribuzione più omogenea può quindi portare ad un controllo migliore degli sforzi [42]. A tal proposito, sta diventando chiaro che nella progettazione di un bioreattore non si può solo pensare alla biocompatibilità e alle proprietà meccaniche [43], ma si devono anche includere informazioni sulla struttura dei pori e la loro interconnessione [44, 45], che deve essere definita in modo opportuno a seconda delle condizioni di flusso usate [46]. Modelli matematici per il flusso all'interno di un bioreattore RWV sono stati sviluppati e validati attraverso la misurazione sperimentale con un laser-Doppler per determinare gli effetti della velocità di rotazione e del tasso di perfusione [47]. Analogamente, il campo di moto e gli sforzi indotti attorno ad un costrutto 3D in un bioreattore spinner-flask sono stati caratterizzati attraverso un modello CFD usato insieme misurazioni di velocità attraverso immagini di particelle [48]. Queste simulazioni e misurazioni possono essere successivamente combinate con dati istologici di Ingegneria dei Tessuti, mettendo in relazione l'ambiente fluido dinamico locale attorno il costrutto con il processo di crescita e le proprietà finali del tessuto generato, come un'estensione del modello diffusivo precedentemente sviluppato per la deposizione del GAG nel costrutto cartilagineo cresciuto in un bioreattore RWV [49].

### 1.3 Condizionamento meccanico

Numerose evidenze sperimentali mostrano che le forze meccaniche, che sono note essere degli importanti modulatori della fisiologia della cellula, possono incrementare l'attività di biosintesi delle cellule nelle matrici bioartificiali e, quindi, la possibilità di accelerare la rigenerazione dei tessuti *in vitro* [3]. Vari studi hanno dimostrato la validità di questo principio, par-

ticolarmente nel contesto dell'Ingegneria dei Tessuti muscolosceletrici. Per esempio, allungamenti meccanici ciclici hanno mostrato: (i) un miglioramento nella proliferazione e nell'organizzazione della matrice per le cellule cardiache umane seminate su uno scaffold a matrice gelatinosa [50]; (ii) un miglioramento delle proprietà meccaniche dei tessuti generati dalle cellule muscolo-sceletriche sospese nel collagene [51] e (iii) un incremento dell'organizzazione del tessuto e la formazione di elastina da parte delle cellule della muscolatura liscia seminate in uno scaffold polimerico [52]. Sforzi radiali pulsatili in scaffold tubolari seminati con cellule della muscolatura liscia aumentano l'organizzazione della struttura e la ritenzione di sutura dei vasi sanguigni ottenuti, e permettere ai vasi di rimanere aperti per quattro settimane dopo l'innesto *in vivo* [53]. Il carico deformante dinamico o lo sforzo dei condrociti posti in un ambiente 3D stimola la sintesi del GAG [54, 55] ed incrementa le proprietà meccaniche del tessuto risultante [55, 56]. Sforzi traslazionali e rotazionali applicati alle cellule progenitrici mesenchimali poste in un gel di collagene inducono l'allineamento delle cellule, la formazione di fibre di collagene orientate e l'aumento dell'attività recettoriale dei geni specifici per i legamenti [57]. Nonostante i numerosi studi che mostrano l'importanza degli stimoli meccanici per migliorare le proprietà strutturali e funzionali dei tessuti ingegnerizzati, poco si conosce circa le specifiche forze meccaniche o regimi di applicazione che risultano stimolanti per un particolare tessuto. Inoltre, i tessuti a differenti stadi di sviluppo possono richiedere differenti regimi di condizionamenti meccanici. In questo contesto altamente complesso, una più profonda comprensione dei fenomeni può essere raggiunta solo attraverso esperimenti mirati a chiarire i meccanismi sottostanti i processi di risposta da parte delle cellule a determinati stimoli meccanici. Più in particolare, i bioreattori possono avere un ruolo importante, in quanto forniscono un ambiente controllato per applicazioni riproducibili e accurate di specifici regimi di forze meccaniche applicate a costrutti tridimensionali [58] (Figura 1.1e). Tutto ciò deve essere accoppiato con analisi quantitative e modelli computazionali delle forze meccaniche applicate alle cellule negli

scaffold. I bioreattori si prestano anche a valutare *in vitro* gli effetti fisiopatologici delle forze fisiche nello sviluppo dei tessuti e a predire le risposte di tali tessuti a forze fisiologiche durante le impiantazioni chirurgiche. Insieme alle caratterizzazioni biomeccaniche, i bioreattori possono fornire importanti indicazioni su quando un tessuto possiede una sufficiente integrità meccanica e risponde a specifici requisiti biologici per essere impiantato [59]. Inoltre, analisi quantitative e modelli computazionali degli sforzi meccanici subiti da normali tessuti *in vivo* e dalle controparti *in vitro*, possono determinare dei regimi potenziali per la riabilitazione dei pazienti che ricevono il tessuto [3].

## 1.4 Quadro sintetico dei fenomeni in un bioreattore

Passiamo ora alla descrizione qualitativa dei fenomeni che avvengono all'interno del bioreattore. Essenzialmente il bioreattore è un dispositivo atto alla crescita delle cellule, che vengono seminate su di una matrice porosa e che vengono nutrite attraverso il fluido che scorre attraverso lo scaffold. Con riferimento alla figura 1.3 descriviamo tali fenomeni. Il trasferimento di massa di ossigeno è dovuto sia alla convezione che alla diffusione ed influenza il consumo dell'ossigeno: maggiore sarà il trasporto di massa e più grande sarà il consumo dell'ossigeno che di conseguenza farà aumentare la proliferazione cellulare. Dato che le cellule proliferano e vanno ad invadere gli spazi vuoti dello scaffold, la porosità e la permeabilità dello scaffold diminuiscono e lo spazio lasciato per nuove cellule decresce. Ciò innesca il meccanismo di inibizione per contatto: le cellule rallentano il loro metabolismo all'aumentare della loro densità e alla fine si blocca il meccanismo di divisione cellulare una volta raggiunto un livello critico di densità cellulare. Un modello completo dovrebbe includere il metabolismo delle cellule, la loro crescita e la loro morte oltre che altri aspetti legati all'anzianità della cellula. Nel nostro lavoro non terremo conto delle differenze di età tra le cellule, la loro dimensione e forma ma daremo una descrizione media del consumo di ossigeno. Dato

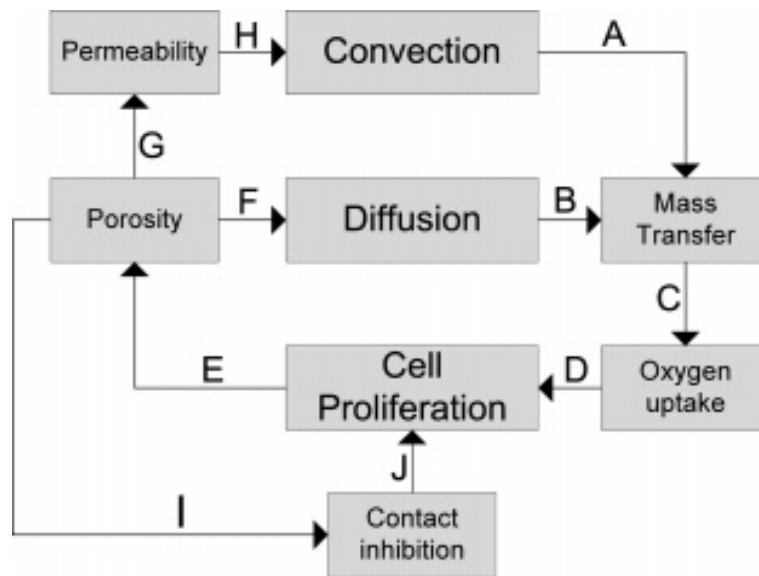


Figura 1.3: Fenomeni interagenti in un bioreattore a perfusione.

che il sistema è posto in un ambiente a temperatura controllata e costante, i fenomeni legati allo scambio di calore e l'evoluzione della temperatura vengono trascurati. I cambiamenti nella densità del mezzo nutriente ed al suo pH vengono ignorati. Per modellare gli effetti della morte delle cellule sul tasso di crescita inseriamo nel nostro modello un termine cinetico. Quello che andremo perciò a modellare sarà il campo di moto del fluido nutriente all'interno dello scaffold, la concentrazione di nutriente e la crescita cellulare. Il campo di moto a livello microscopico, cioè quando il dettaglio ci permette di distinguere tra cellule e intercapedini tra i pori della matrice, viene governato dalle equazioni di Navier-Stokes. Dato che però siamo interessati ad una descrizione macroscopica del bioreattore, attraverso il processo di *media volumetrica* andremo a costruire un sistema di equazioni in grado di tenere conto della variazione della geometria dei pori a causa della diminuzione della porosità dovuta alla crescita cellulare. Per quanto riguarda l'evoluzione della concentrazione, guardando ancora a livello microscopico, avremmo due diversi modelli. Nella fase fluida useremmo un'equazione di diffusione e trasporto in quanto si ipotizza che all'interno del fluido non ci siano cellule



sospese che possano consumare il nutriente. All'interno delle cellule, invece, avremmo un'equazione di diffusione e reazione in quanto le reazioni chimiche che consentono alla cellulare di crescere consumano necessariamente il nutriente. A livello macroscopico avremo però un'equazione di diffusione-trasporto-reazione mediata, allo scopo di tenere conto di entrambi i modelli sopra descritti senza però distinguere tra le due fasi. Il termine reattivo viene modellato attraverso la cinetica di Michaelis-Menten che tiene conto del consumo di nutriente da parte della cellula. Infine la crescita cellulare viene seguita globalmente attraverso la frazione volumetrica di cellule. Quest'ultima rappresenta la porzione di volume di scaffold occupato dalle cellule, la cui evoluzione viene descritta da un modello di diffusione e reazione. Il termine reattivo conterrà la cinetica delle cellule che tiene conto, come precedentemente detto, del massimo tasso di crescita delle cellule e della loro morte. Tale termine è modellato attraverso la cinetica di Contois modificata. Già da questa descrizione vediamo che i fenomeni in gioco sono decisamente interdipendenti, il modello matematico che andremo a costruire presenterà dunque un forte accoppiamento. A livello numerico tale accoppiamento verrà risolto utilizzando un algoritmo iterativo a blocchi al cui interno il problema globale viene diviso in sottoproblemi disaccoppiati da risolvere in successione. In ciascuno di questi blocchi andremo a risolvere una singola incognita alla volta, fissando le rimanenti ad un valore noto.

# Capitolo 2

## Il Modello Matematico

In questa seconda parte della tesi vogliamo descrivere il modello matematico che governa il funzionamento del bioreattore. Partendo dalle equazioni microscopiche, attraverso il processo di *media volumetrica* andremo a costruire le equazioni macroscopiche che verranno poi risolte numericamente. Dato che il modello è descritto da equazioni alle derivate parziali, particolare attenzione sarà posta alle condizioni al contorno e iniziali. Come ultimo passo, prima della risoluzione numerica, mostreremo il processo di adimensionalizzazione che ci consentirà di semplificare il modello evidenziandone i principali numeri caratteristici del problema in oggetto.

Scriviamo subito le definizioni e i teoremi che ci serviranno per mettere in atto il processo di media volumetrica.

### 2.1 Il processo di media volumetrica

Dato che il nostro scopo è ottenere delle equazioni che descrivano i fenomeni al livello macroscopico dello scaffold e non a quello microscopico delle cellule, dobbiamo mediare in maniera opportuna le equazioni microscopiche. L'idea [60, 61] è fare una media delle nostre grandezze ed equazioni all'interno di un volume di riferimento che chiameremo  $V$  (Figura 2.1). All'interno dello

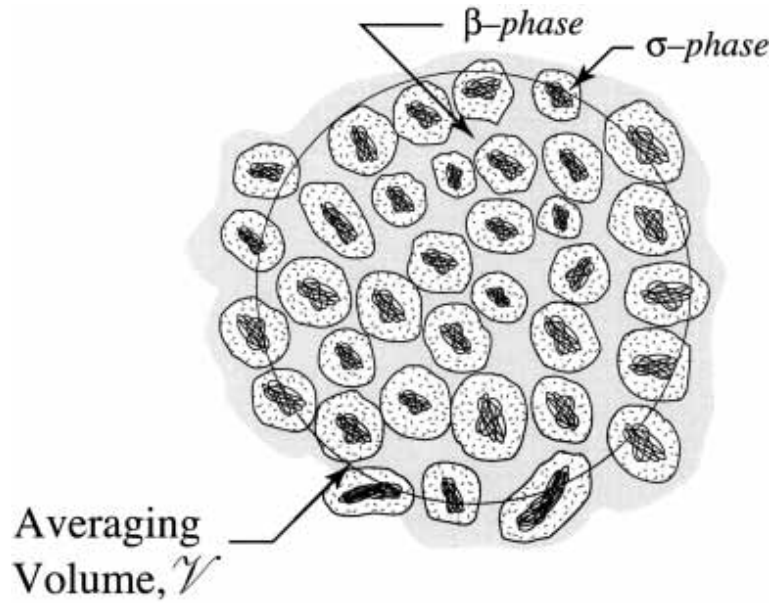


Figura 2.1: Rappresentazione di un volume di riferimento al cui interno applicare il metodo della *media volumetrica*.

scaffold abbiamo essenzialmente tre componenti o fasi: il fluido nutriente, le cellule e la matrice porosa sulla quale le cellule attecchiscono. Chiameremo rispettivamente *fase  $\beta$*  la parte di scaffold occupata dal fluido nutriente, *fase  $\sigma$*  la porzione occupata dalle cellule ed infine *fase  $s$*  la parte di volume occupata dalla matrice porosa. Definiamo ora il concetto di *frazione volumetrica* e cioè la porzione di volume occupato rispettivamente dalle tre fasi all'interno del volume di riferimento:

$$\left\{ \begin{array}{l} \varepsilon_{\beta} := \frac{V_{\beta}(t)}{V} \\ \varepsilon_{\sigma} := \frac{V_{\sigma}(t)}{V} \\ \varepsilon_s := \frac{V_s}{V} \\ \varepsilon_{\beta}(t) + \varepsilon_{\sigma}(t) + \varepsilon_s = 1 \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} (2.1a) \\ (2.1b) \\ (2.1c) \\ (2.1d) \end{array}$$

È importante notare che  $V$  e  $V_s$  sono due quantità costanti nel tempo, mentre  $V_\beta = V_\beta(t)$  e  $V_\sigma = V_\sigma(t)$ , in questo modo otteniamo l'equazione (2.1d)  $\forall t \geq 0$ . Inoltre abbiamo ipotizzato che la matrice porosa sia impermeabile al nutriente, quindi nel seguito non ci sarà alcuna concentrazione di nutriente associata alla fase  $\varepsilon_s$ . Introduciamo ora le concentrazioni mediate utili per lo sviluppo delle equazioni macroscopiche. A tale scopo indichiamo con  $c_\beta$  e  $c_\sigma$  la concentrazione di nutriente rispettivamente nella fase fluida e in quella cellulare e definiamo le *concentrazioni medie* nel volume  $V$ :

$$\left\{ \begin{array}{l} \langle c_\beta \rangle := \frac{1}{V} \int_{V_\beta} c_\beta dV \\ \langle c_\sigma \rangle := \frac{1}{V} \int_{V_\sigma} c_\sigma dV \end{array} \right. \quad (2.2a)$$

$$(2.2b)$$

Le definizioni (2.2a)-(2.2b) presentano il problema che, se la concentrazione è costante nei due volumi  $V_\beta$  e  $V_\sigma$ , la sua media non coincide con tale valore. Per rimuovere tale problema si introducono le seguenti *concentrazioni intrinseche*:

$$\left\{ \begin{array}{l} \langle c_\beta \rangle^\beta := \frac{1}{V_\beta} \int_{V_\beta} c_\beta dV \\ \langle c_\sigma \rangle^\sigma := \frac{1}{V_\sigma} \int_{V_\sigma} c_\sigma dV \end{array} \right. \quad (2.3a)$$

$$(2.3b)$$

Le (2.3a)-(2.3b) corrispondono alle concentrazioni che si potrebbero misurare con la tecnica del microelettrodo [62]. Associata alle (2.3a-2.3b), introduciamo inoltre la seguente ulteriore definizione:

$$\left\{ \begin{aligned} \langle c \rangle &:= \varepsilon_\beta \langle c_\beta \rangle^\beta + \varepsilon_\sigma \langle c_\sigma \rangle^\sigma = \\ &= \frac{V_\beta}{V} \frac{1}{V_\beta} \int_{V_\beta} c_\beta dV + \frac{V_\sigma}{V} \frac{1}{V_\sigma} \int_{V_\sigma} c_\sigma dV = \\ &= \frac{1}{V} \left( \int_{V_\beta} c_\beta dV + \int_{V_\sigma} c_\sigma dV \right) = \\ &= \langle c_\beta \rangle + \langle c_\sigma \rangle \end{aligned} \right. \quad (2.4)$$

La (2.4) è la *concentrazione spaziale media* nel volume  $V$  e corrisponde alla concentrazione di una specie chimica misurata mediante la risposta spettroscopica del biofilm alla somministrazione di una sostanza chimica.

Allo scopo di pervenire ad un modello mediato in funzione di *un'unica* concentrazione di nutriente, è conveniente introdurre l'ipotesi [60, 63] di *equilibrio locale di massa*:

$$\langle c_\beta \rangle^\beta = \frac{1}{K_{eq}} \langle c_\sigma \rangle^\sigma \quad (2.5)$$

e la ulteriore *concentrazione di equilibrio*:

$$\{c\} := \varepsilon_\beta \langle c_\beta \rangle^\beta + \varepsilon_\sigma \frac{1}{K_{eq}} \langle c_\sigma \rangle^\sigma \quad (2.6)$$

Tale concentrazione fornisce una misura del potenziale chimico associato alla distribuzione di concentrazione  $c$ . Sostituendo la (2.5) nella (2.6) si ottiene:

$$\{c\} = \varepsilon_\beta \langle c_\beta \rangle^\beta + \varepsilon_\sigma \frac{K_{eq}}{K_{eq}} \langle c_\beta \rangle^\beta = \langle c_\beta \rangle^\beta = \frac{1}{K_{eq}} \langle c_\sigma \rangle^\sigma \quad (2.7)$$

La precedente espressione è fondamentale per derivare un modello macroscopico di trasporto di massa. L'equazione (2.7) rappresenta la concentrazione macroscopica della specie chimica considerata all'interno del volume rappresentativo di biofilm  $V$ , sotto l'ipotesi di equilibrio locale di massa. Altro importante strumento per costruire le nostre equazioni macroscopiche è il *teorema di media spaziale*:

$$\langle \nabla \phi_\beta \rangle = \nabla \langle \phi_\beta \rangle + \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} \mathbf{n}_{\beta\sigma} \phi_\beta dS \quad (2.8)$$

dove  $\phi_\beta$  è una quantità associata alla fase  $\beta$ ,  $A_{\beta\sigma}$  è la superficie di interfaccia tra la fase fluida e quella cellulare mentre  $\mathbf{n}_{\beta\sigma}$  è la normale uscente dalla superficie d'interfaccia.

Nella prossima sezione applichiamo il procedimento della media volumetrica per derivare il sistema di equazioni macroscopiche costituenti il modello di crescita del costruito cellulare.

## 2.2 Le equazioni macroscopiche mediate

È riportata in Figura 2.2 una schematizzazione bidimensionale del bioreattore. All'interno dello scaffold dobbiamo seguire l'evoluzione del fluido nutriente e delle cellule. A livello microscopico il fluido nutriente sarà governato dalle equazioni di Navier-Stokes mentre il nutriente, da esso trasportato, viene descritto da un'equazione di diffusione e trasporto per quanto riguarda la fase  $\beta$  mentre nella fase  $\sigma$  avremo un'equazione di diffusione e reazione. L'evoluzione cellulare, modellata attraverso la variabile  $\varepsilon_\sigma$ , è rappresentata attraverso un'equazione di diffusione e reazione.

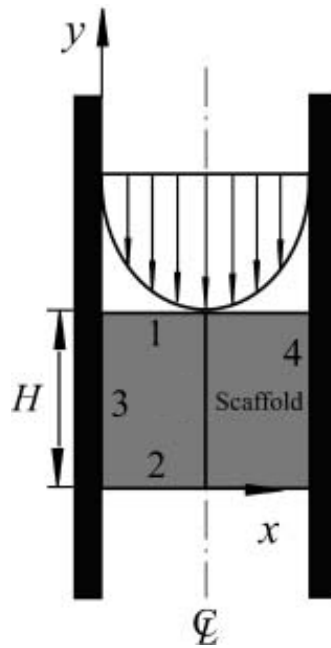


Figura 2.2: Rappresentazione schematica dello scaffold.

### 2.2.1 Il modello fluido

Introduciamo preventivamente la definizione di velocità e pressione di Darcy:

$$\begin{cases} \mathbf{V} := \varepsilon_\beta \langle \mathbf{v}_\beta \rangle^\beta & (2.9a) \\ P := \varepsilon_\beta \langle p_\beta \rangle^\beta & (2.9b) \end{cases}$$

L'equazione di continuità è data dal bilancio tra la variazione nel tempo della massa fluida contenuta nel volume di riferimento  $V$  ed il flusso netto di massa che attraversa  $V$ , avremo dunque:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial}{\partial t} \int_V \rho_\beta dV &= \frac{\partial}{\partial t} \int_{V_\beta} \rho_\beta dV = \\
&= \{ \text{dato che } \rho_\beta = \text{costante} \} = \\
&= \rho_\beta \frac{\partial V_\beta}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} (\rho_\beta V_\beta)
\end{aligned}$$

e anche:

$$\begin{aligned}
\sum_{\#Cell \text{ in } V} \rho_\beta \mathbf{v}_\beta \cdot \mathbf{n}_{Cell} + \int_{\partial V} \rho_\beta \mathbf{v}_\beta \cdot d\mathbf{S} &= \\
&= \int_{\partial V} \rho_\beta \mathbf{v}_\beta \cdot d\mathbf{S} = \int_V div(\rho_\beta \mathbf{v}_\beta) dV
\end{aligned}$$

da cui si ottiene:

$$\rho_\beta \frac{\partial V_\beta}{\partial t} + \int_V div(\rho_\beta \mathbf{v}_\beta) dV = 0$$

Operiamo la media della precedente relazione sul volume di riferimento  $V$ , fisso nello spazio e nel tempo, ottenendo:

$$\rho_\beta \frac{\partial \varepsilon_\beta}{\partial t} + \frac{\rho_\beta}{V} \int_V div \mathbf{v}_\beta dV = 0$$

Passiamo quindi dal livello microscopico a quello macroscopico nel secondo termine della precedente equazione:

$$\begin{aligned}
\frac{1}{V} \int_V div \mathbf{v}_\beta dV &= div \left[ \frac{V_\beta}{V} \frac{1}{V_\beta} \int_{V_\beta} \mathbf{v}_\beta dV \right] + \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} \mathbf{v}_\beta d\mathbf{S} = \\
&= div \left[ \varepsilon_\beta \langle \mathbf{v}_\beta \rangle^\beta \right] = div \mathbf{V}
\end{aligned}$$



da cui si ricava:

$$\frac{\partial \varepsilon_\beta}{\partial t} + \operatorname{div} \mathbf{V} = 0 \quad (2.10)$$

L'equazione (2.10) ci dice che, passando al livello macroscopico, il fluido è *pseudo-comprimibile*. Passiamo ora alla costruzione dell'equazione del moto. A livello microscopico abbiamo l'equazione di Navier-Stokes:

$$\begin{cases} \rho_\beta \left[ \frac{\partial \mathbf{v}_\beta}{\partial t} + \operatorname{div} (\mathbf{v}_\beta \otimes \mathbf{v}_\beta) \right] = \operatorname{div} \mathbf{T} (\mathbf{v}_\beta, p_\beta) + \rho_\beta \mathbf{g} \\ \text{dove } \mathbf{T} (\mathbf{v}_\beta, p_\beta) := 2\mu_\beta \boldsymbol{\epsilon} (\mathbf{v}_\beta) - p_\beta \boldsymbol{\delta}, \quad \boldsymbol{\epsilon} (\mathbf{v}_\beta) = \nabla \mathbf{v}_\beta + (\nabla \mathbf{v}_\beta)^T \end{cases}$$

Come fatto per l'equazione di continuità, eseguiamo il processo di media volumetrica:

$$\begin{aligned} \frac{1}{V} \int_V \rho_\beta \left[ \frac{\partial \mathbf{v}_\beta}{\partial t} + \operatorname{div} (\mathbf{v}_\beta \otimes \mathbf{v}_\beta) \right] dV &= \frac{1}{V} \int_V \operatorname{div} \mu_\beta \left[ \nabla \mathbf{v}_\beta + (\nabla \mathbf{v}_\beta)^T \right] dV + \\ &\quad - \frac{1}{V} \int_V \operatorname{div} (p_\beta \boldsymbol{\delta}) dV \end{aligned}$$

Per chiarezza, esaminiamo singolarmente gli addendi della precedente equazione:

$$\frac{1}{V} \int_V \rho_\beta \frac{\partial \mathbf{v}_\beta}{\partial t} dV = \rho_\beta \frac{\partial}{\partial t} \frac{1}{V} \int_{V_\beta} \mathbf{v}_\beta dV = \rho_\beta \frac{\partial}{\partial t} (\varepsilon_\beta \langle \mathbf{v}_\beta \rangle^\beta) = \rho_\beta \frac{\partial \mathbf{V}}{\partial t}$$

$$\begin{aligned}
\frac{1}{V} \int_V \rho_\beta \operatorname{div}(\mathbf{v}_\beta \otimes \mathbf{v}_\beta) dV &= \\
&= \rho_\beta \frac{1}{V} \int_{V_\beta} \operatorname{div}(\mathbf{v}_\beta \otimes \mathbf{v}_\beta) dV = \\
&= \rho_\beta \left\{ \operatorname{div} \frac{1}{V} \int_{V_\beta} (\mathbf{v}_\beta \otimes \mathbf{v}_\beta) dV + \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} (\mathbf{v}_\beta \otimes \mathbf{v}_\beta) d\mathbf{S} \right\} = \\
&= \rho_\beta \left\{ \operatorname{div} \left[ \varepsilon_\beta (\langle \mathbf{v}_\beta \rangle^\beta \otimes \langle \mathbf{v}_\beta \rangle^\beta) \right] \right\} = \\
&= \rho_\beta \operatorname{div} \left( \frac{\mathbf{V} \otimes \mathbf{V}}{\varepsilon_\beta} \right)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{1}{V} \int_V \operatorname{div} \mu_\beta [\nabla \mathbf{v}_\beta + (\nabla \mathbf{v}_\beta)^T] dV &= \\
&= \mu_\beta \frac{1}{V} \int_{V_\beta} \operatorname{div} [\nabla \mathbf{v}_\beta + (\nabla \mathbf{v}_\beta)^T] dV = \\
&= \mu_\beta \operatorname{div} \frac{1}{V} \int_{V_\beta} [\nabla \mathbf{v}_\beta + (\nabla \mathbf{v}_\beta)^T] dV + \\
&+ \mu_\beta \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} [\nabla \mathbf{v}_\beta + (\nabla \mathbf{v}_\beta)^T] \cdot d\mathbf{S} = \\
&= \mu_\beta \operatorname{div} \left[ \left( \nabla \frac{1}{V} \int_{V_\beta} \mathbf{v}_\beta dV + \left( \nabla \frac{1}{V} \int_{V_\beta} \mathbf{v}_\beta dV \right)^T \right) + \right. \\
&+ \left. \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} \mathbf{v}_\beta d\mathbf{S} \right] + \mu_\beta \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} (\nabla \mathbf{v}_\beta + (\nabla \mathbf{v}_\beta)^T) \cdot d\mathbf{S} = \\
&= \mu_\beta \operatorname{div} \left[ \nabla (\varepsilon_\beta \langle \mathbf{v}_\beta \rangle^\beta) + (\nabla (\varepsilon_\beta \langle \mathbf{v}_\beta \rangle^\beta))^T \right] + \\
&+ \mu_\beta \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} [\nabla \mathbf{v}_\beta + (\nabla \mathbf{v}_\beta)^T] \cdot d\mathbf{S} = \\
&= \mu_\beta \operatorname{div} [\nabla (\mathbf{V}) + (\nabla (\mathbf{V}))^T] + \\
&+ \mu_\beta \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} [\nabla \mathbf{v}_\beta + (\nabla \mathbf{v}_\beta)^T] \cdot d\mathbf{S} = \\
&= 2\mu_\beta \operatorname{div} \boldsymbol{\epsilon}(\mathbf{V}) + 2\mu_\beta \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} \boldsymbol{\epsilon}(\mathbf{v}_\beta) \cdot d\mathbf{S}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
-\frac{1}{V} \int_V \operatorname{div} (p_\beta \boldsymbol{\delta}) dV &= \\
&= -\boldsymbol{\nabla} \left( \frac{1}{V} \int_{V_\beta} p_\beta dV \right) - \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} p_\beta d\mathbf{S} = \\
&= -\boldsymbol{\nabla} P - \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} p_\beta d\mathbf{S} \\
&+ \frac{1}{V} \int_V \rho_\beta \mathbf{g} dV = \rho_\beta \mathbf{g}
\end{aligned}$$

Unendo i vari termini otteniamo:

$$\rho_\beta \left[ \frac{\partial \mathbf{V}}{\partial t} + \operatorname{div} \left( \frac{\mathbf{V} \otimes \mathbf{V}}{\varepsilon_\beta} \right) \right] = \operatorname{div} \mathbf{T}(\mathbf{V}, P) + \mathbf{B}(\mathbf{v}_\beta, p_\beta) + \rho_\beta \mathbf{g} \quad (2.11)$$

dove il nuovo termine  $\mathbf{B}(\mathbf{v}_\beta, p_\beta)$ , detto *correzione di Brinkman*, è definito da:

$$\mathbf{B}(\mathbf{v}_\beta, p_\beta) := -\frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} p_\beta d\mathbf{S} + \frac{\mu_\beta}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} \left[ \boldsymbol{\nabla} \mathbf{v}_\beta + (\boldsymbol{\nabla} \mathbf{v}_\beta)^T \right] \cdot d\mathbf{S} \quad (2.12)$$

Utilizzando poi la definizione del tensore degli sforzi  $\mathbf{T}(\mathbf{v}_\beta, p_\beta)$ , possiamo scrivere il termine  $\mathbf{B}(\mathbf{v}_\beta, p_\beta)$  come:

$$\mathbf{B}(\mathbf{v}_\beta, p_\beta) = \frac{1}{V} \int_{A_{\beta\sigma}} \mathbf{T}(\mathbf{v}_\beta, p_\beta) \cdot d\mathbf{S}$$

Questo termine descrive la resistenza al moto del fluido esercitata per attrito dalla parete solida dello scaffold. Dato che tale resistenza dipende dalla velocità microscopica  $\mathbf{v}_\beta$  e dalla pressione microscopica  $p_\beta$ , è necessario introdurre un *modello di chiusura* per  $\mathbf{B}$  in funzione della velocità di Darcy. Si ha:

$$\mathbf{B} = -\frac{\mu_\beta \varepsilon_\beta \mathbf{V}}{K(\varepsilon_\beta)} \quad (2.13)$$

dove:

$$K(\varepsilon_\beta) = K_p \frac{\varepsilon_\beta^3}{(1 - \varepsilon_\beta)^2} \quad (2.14)$$

è la permeabilità idraulica del mezzo poroso, espressa attraverso la legge di Carman-Kozeny [64, Whitaker, 1999, cap. 4].

### 2.2.2 Il modello per il nutriente

Andiamo ora ad esaminare l'evoluzione della concentrazione all'interno della cellula e del fluido nutriente. Iniziamo analizzando cosa succede all'interfaccia tra la fase  $\beta$  e la fase  $\sigma$  (Figura 2.3). Nella fase fluida, a livello microscopico, abbiamo un modello di diffusione e trasporto per la concentrazione. All'interno della cellula, invece, avremo solo diffusione della concentrazione più un termine di reazione che simula le reazioni chimiche che avvengono nella cellula. Avremo perciò due concentrazioni di nutriente, una all'interno della cellula chiamata  $c_\sigma$  e una associata al fluido esterno denominata rispettivamente  $c_\beta$ . Andiamo di conseguenza a definire i due flussi di nutriente che attraversano l'interfaccia tra fase  $\beta$  e fase  $\sigma$  e il sistema di equazioni che descrivono i precedenti fenomeni:

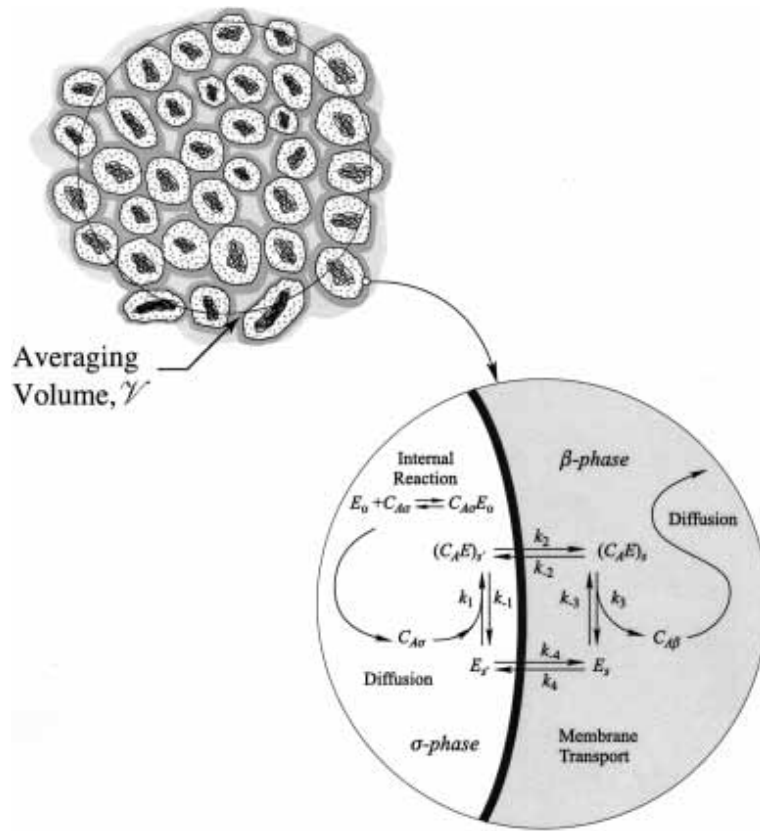


Figura 2.3: Un volume di media su una regione rappresentativa di biofilm.

$$\begin{cases} \mathbf{J}_\beta := -D_\beta \nabla c_\beta + c_\beta \mathbf{v}_\beta & (2.15a) \\ \mathbf{J}_\sigma := -D_\sigma \nabla c_\sigma & (2.15b) \end{cases}$$

Indicando con  $\Gamma$  l'interfaccia di separazione tra  $V_\beta$  e  $V_\sigma$ , il modello microscopico per il flusso di nutriente è descritto dal seguente sistema:

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{\partial c_\sigma}{\partial t} + \operatorname{div} \mathbf{J}_\beta = 0 & \text{in } V_\beta \quad (2.16a) \\ \frac{\partial c_\sigma}{\partial t} + \operatorname{div} \mathbf{J}_\beta = -\mu \frac{c_\sigma}{K + c_\sigma} & \text{in } V_\sigma \quad (2.16b) \\ \mathbf{J}_\beta \cdot \mathbf{n}_\beta + \mathbf{J}_\sigma \cdot \mathbf{n}_\sigma = 0 & \text{su } \Gamma \quad (2.16c) \\ \mathbf{J}_\sigma \cdot \mathbf{n}_\sigma = \frac{E_0 (c_\beta - \alpha_1 c_\sigma)}{\alpha_2 + \alpha_3 c_\beta + \alpha_4 c_\sigma + \alpha_5 c_\beta c_\sigma} & \text{su } \Gamma \quad (2.16d) \end{array} \right.$$

dove  $\mathbf{n}_\beta$  e  $\mathbf{n}_\sigma$  sono le normali uscenti da  $V_\beta$  e  $V_\sigma$  rispettivamente. Abbiamo dunque: il trasporto di massa nella fase  $\beta$  (extracellulare) modellato dall'equazione (2.16a); il corrispettivo trasporto di massa nella fase  $\sigma$  (intracellulare) descritto dall'equazione (2.16b); l'equazione (2.16c) rappresenta la conservazione del flusso di massa all'interfaccia; infine l'equazione (2.16d) tiene conto del trasporto di massa attraverso la membrana mediato da proteine. Possiamo ora passare all'equazione di nostro interesse, quelle al livello macroscopico. Come precedentemente fatto per le equazioni del fluido, mediamo le equazioni (2.16a-2.16d) sul volume  $V$ , utilizziamo le relazioni (2.6)-(2.7)-(2.8) e sommiamo le equazioni, ottenendo la seguente *equazione per il trasporto di massa nel biofilm*:

$$\frac{\partial}{\partial t} [(\varepsilon_\beta + \alpha_1^{-1} \varepsilon_\sigma) \{c\}] + \operatorname{div} (-D_{eff} \nabla \{c\} + \{c\} \mathbf{v}) = -\frac{\varepsilon_\sigma \mu \{c\}}{\{c\} + \alpha_1 K} \quad (2.17)$$

dove abbiamo utilizzato le seguenti grandezze:  $D_{eff}$ , coefficiente di diffusione efficace [ $m^2 s^{-1}$ ];  $\mu$ , valore massimo del tasso metabolico [ $mol m^{-3} s^{-1}$ ];  $K = \frac{D_\sigma}{D_\beta} \alpha_1^{-1}$ , [ $mol m^{-3}$ ];  $\alpha_1$ , coefficiente di equilibrio [*adimensionale*]. Per il coefficiente di diffusione efficace  $D_{eff}$  si è scelto di usare il modello di *Maxwell* [64, Whitaker, 1999, cap.1]:

$$D_{eff} = D_\beta \left( \frac{3K - 2\varepsilon_\beta (K - 1)}{3 + \varepsilon_\beta (K - 1)} \right) \quad (2.18)$$

Inoltre, analizzando il comportamento al limite di questo coefficiente di diffusione, notiamo che:

$$\left\{ \begin{array}{l} \lim_{\varepsilon_\beta \rightarrow 0^+} D_{eff} = D_\beta K = D_\beta \frac{D_\sigma}{D_\beta} \alpha_1^{-1} = \alpha_1^{-1} D_\sigma \quad (2.19a) \\ \lim_{\varepsilon_\beta \rightarrow 1^-} D_{eff} = D_\beta \frac{K+2}{K+2} = D_\beta \quad (2.19b) \\ \lim_{K \rightarrow 0^+} D_{eff} = D_\beta \frac{2\varepsilon_\beta}{3-\varepsilon_\beta} = 2D_\beta \frac{(1-\varepsilon_\sigma)}{2+\varepsilon_\sigma} \quad (2.19c) \end{array} \right.$$

### 2.2.3 Il modello per le cellule

Ci rimane ora solo da studiare l'equazione che governa l'evoluzione delle cellule. Dato che stiamo creando un modello macroscopico del bioreattore, non ci interessa seguire l'evoluzione delle cellule singolarmente, ma nella loro globalità. Utilizziamo a questo scopo la frazione volumetrica associata alla fase cellulare:  $\varepsilon_\sigma$ . I fenomeni che il modello deve descrivere sono: la crescita delle cellule, in numero e dimensione, a causa del consumo di nutriente; il movimento delle cellule all'interno della matrice porosa; la morte delle cellule. Avremo un'equazione di diffusione e reazione:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial \varepsilon_\sigma}{\partial t} + \operatorname{div} \mathbf{F}_\sigma(\varepsilon_\sigma) = \left( \frac{R_g \{c\}}{\{c\} + \alpha_1 K_c \rho_{cell} \varepsilon_\sigma} - R_d \right) \varepsilon_\sigma \quad (2.20a) \\ \mathbf{F}_\sigma(\varepsilon_\sigma) = -D_{cell} \nabla \varepsilon_\sigma \quad (2.20b) \end{array} \right.$$

Il termine diffusivo tiene conto del moto browniano delle cellule. Il termine tra parentesi tonde è la *cinetica di Contois modificata* [65]; questa tiene conto della proliferazione delle cellule all'interno dello scaffold e della loro morte.

## 2.3 Le condizioni al bordo e iniziali

Illustriamo nel seguito le condizioni al bordo e iniziali da associare ai precedenti sistemi di equazioni alle derivate parziali.

Per il modello che governa il moto del fluido imporremo che all'istante iniziale la velocità sia nulla. Per quanto riguarda le condizioni al contorno avremo un profilo parabolico per la velocità in ingresso, condizioni di aderenza sulle pareti laterali dello scaffold e flusso in uscita nullo. Con riferimento alla Figura 2.2, possiamo riassumere queste condizioni come:

$$\left\{ \begin{array}{ll} \mathbf{V}(\mathbf{x}, t = 0) = \mathbf{0} & \text{in } \Omega \quad (2.21a) \\ \mathbf{V}(\mathbf{x}, t) = -U_0 \frac{x}{L} \left(2 - \frac{x}{L}\right) \mathbf{j} & \text{su } \Gamma_1 \quad (2.21b) \\ \mathbf{V}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{0} & \text{su } \Gamma_{3,4} \quad (2.21c) \\ \mathbf{v} \cdot \nabla \mathbf{V}(\mathbf{x}, t) \cdot \mathbf{n} = 0, p = 0 & \text{su } \Gamma_2 \quad (2.21d) \end{array} \right.$$

dove  $\mathbf{j}$  è il versore orientato come l'asse  $y$  in Figura 2.2.

Per l'equazione che modella l'evoluzione della concentrazione  $\{c\}$  avremo che inizialmente la quantità di nutriente è zero, sul bordo di ingresso sarà posta pari alla concentrazione presente nel serbatoio, cioè  $c_0$ . Sulle pareti laterali imporremo che il flusso di nutriente sia nullo. In uscita, a seconda del livello di perfusione, porremo o una condizione di Dirichlet omogenea o una di Neumann ancora omogenea. Avremo quindi:



$$\left\{ \begin{array}{ll} \{c\}(\mathbf{x}, t = 0) = 0 & \text{in } \Omega \quad (2.22a) \\ \nabla \{c\}(\mathbf{x}, t) \cdot \mathbf{n} = 0 & \text{su } \Gamma_{3,4} \quad (2.22b) \\ \{c\}(\mathbf{x}, t) = 0, \text{ per } Pe_{glob} < 100 & \text{su } \Gamma_2 \quad (2.22c) \\ \nabla \{c\}(\mathbf{x}, t) \cdot \mathbf{n} = 0, \text{ per } Pe_{glob} \geq 100 & \text{su } \Gamma_2 \quad (2.22d) \end{array} \right.$$

Le ultime due condizioni al contorno hanno come discriminante il numero di Péclet che è legato al tasso di perfusione, cioè alla velocità con cui il fluido scorre all'interno del costrutto cellulare. Una condizione di Dirichlet all'uscita dà luogo ad uno strato limite di concentrazione vicino al bordo; all'aumentare del tasso di perfusione, questo strato limite aumenta e a livello numerico questo implicherebbe un raffinamento della mesh in questa zona per seguirne accuratamente l'evoluzione. Per evitare ciò si è deciso di cambiare tipo di condizione al contorno all'aumentare del tasso di perfusione e quindi del numero di Péclet globale, passando ad una condizione di tipo Neumann. La frazione volumetrica, descritta dall'equazione (2.20a), rappresenta la frazione di cellule presenti nello scaffold; avremo quindi che all'inizio tale frazione sarà pari alle cellule seminate. La condizione al contorno è unica per tutti i quattro lati, il flusso in uscita deve essere nullo. Infatti le cellule devono svilupparsi solo all'interno del costrutto cellulare. Riassumendo:

$$\left\{ \begin{array}{ll} \varepsilon_\sigma(\mathbf{x}, t = 0) = \varepsilon_0 & \text{in } \Omega \quad (2.23a) \\ \nabla \varepsilon_\sigma(\mathbf{x}, t) \cdot \mathbf{n} = 0 & \text{su } \Gamma_{1,2,3,4} \quad (2.23b) \end{array} \right.$$

## 2.4 L'Adimensionalizzazione delle equazioni

In questa sezione procediamo a scrivere in forma adimensionale il modello introdotto nelle Sezioni 2.2-2.3. Questo processo ci permetterà di evidenziare quali termini delle equazioni hanno un peso maggiore relativamente agli altri

e quindi procedere a delle semplificazioni. Introduciamo anzitutto le seguenti variabili adimensionali (indicate con il simbolo  $\hat{\cdot}$ ) e i corrispondenti parametri di scaling (indicati con il simbolo  $\bar{\cdot}$ ): adimensionali per le precedenti equazioni:

$$\left\{ \begin{array}{l} \hat{x} := \frac{x}{\bar{x}}, \\ \hat{t} := \frac{t}{\bar{t}}, \\ \hat{v} := \frac{v}{\bar{v}}, \\ \hat{c} := \frac{c}{\bar{c}}, \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} \bar{x} = H[cm] \\ \bar{t} = R_g^{-1}[s] \\ \bar{v} = U_0[cm/s] \\ \bar{c} = c_0[g/cm^3] \end{array} \quad \begin{array}{l} (2.24a) \\ (2.24b) \\ (2.24c) \\ (2.24d) \end{array}$$

Per non appesantire la notazione abbiamo posto il modulo della velocità  $|\mathbf{v}| = v$ ; inoltre, qui e nel seguito, la concentrazione  $c$  corrisponde alla precedente concentrazione  $\{c\}$ . Coerentemente a quanto avviene in letteratura, introduciamo il concetto di *pressione piezometrica*, somma della pressione idrostatica e di quella gravitazionale:

$$p := P - \rho_\beta \mathbf{g} \cdot \mathbf{x} [g \text{ cm}^{-1} \text{ s}^{-2}] \quad (2.25)$$

Di conseguenza riscriviamo il tensore degli sforzi in funzione di  $p$ :

$$-P = -p - \rho_\beta \mathbf{g} \cdot \mathbf{x}, \quad \mathbf{g} := -g\mathbf{j}$$

$$-\nabla P = -\nabla p + \rho_\beta g \nabla y = -\nabla p - \rho_\beta \mathbf{g}$$

$$\Rightarrow \operatorname{div} \mathbf{T}(\mathbf{V}, P) + \rho_\beta \mathbf{g} = \operatorname{div}(\boldsymbol{\epsilon}(\mathbf{V})) - \nabla P + \rho_\beta \mathbf{g} = \operatorname{div}(\boldsymbol{\epsilon}(\mathbf{V})) - \nabla p$$

Abbiamo dunque il *tensore degli sforzi modificato*:

$$\mathbf{T}(\mathbf{V}, p) := 2\mu_\beta \boldsymbol{\epsilon}(\mathbf{V}) - p\boldsymbol{\delta} \quad (2.26)$$

da cui, una volta calcolate le incognite  $\mathbf{V}$  e  $p$ , la pressione idrostatica si potrà post-calcolare come:

$$P = p + \rho_\beta \mathbf{g} \cdot \mathbf{x} = p - \rho_\beta g y$$

Lo scaling per la pressione sarà:

$$\hat{p} := \frac{p}{\bar{p}}, \quad \bar{p} = \mu_\beta \frac{\bar{v}\bar{x}}{K_p} [g \text{ cm}^{-1} \text{ s}^{-22}] \quad (2.27)$$

Il processo di adimensionalizzazione porta alle seguenti equazioni (dove, per semplicità, abbiamo utilizzato la medesima notazione per le quantità adimensionali):

$$\left\{ \begin{array}{l} \delta_V \frac{\partial \varepsilon_\beta}{\partial t} + \operatorname{div} \mathbf{V} = 0 \\ \operatorname{ReDa} \left[ \delta_V \frac{\partial \mathbf{V}}{\partial t} + \operatorname{div} \left( \frac{\mathbf{V} \otimes \mathbf{V}}{\varepsilon_\beta} \right) \right] \\ \mathbf{T}(\mathbf{V}, p) = 2Da \boldsymbol{\epsilon}(\mathbf{V}) - p \boldsymbol{\delta} \\ \chi(\varepsilon_\beta) = \frac{\varepsilon_\beta^2}{(1 - \varepsilon_\beta)^2} \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} (2.28a) \\ = 2Da \operatorname{div} \boldsymbol{\epsilon}(\mathbf{V}) + \\ - \boldsymbol{\nabla} p - \chi^{-1}(\varepsilon_\beta) \mathbf{V} \\ (2.28d) \\ (2.28e) \end{array} \quad \begin{array}{l} (2.28b) \\ (2.28c) \end{array}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \delta_D \frac{\partial}{\partial t} [(\varepsilon_\beta + K_{eq} \varepsilon_\sigma) c] + \operatorname{div} \mathbf{J}(c, \mathbf{V}) = - \frac{\widehat{R}_m c}{c + \widehat{K}_m} \varepsilon_\sigma \end{array} \right. \quad (2.29a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \mathbf{J}(c, \mathbf{V}) = - \widehat{D}_{eff}^{nutr}(\varepsilon_\beta) \boldsymbol{\nabla} c + Pe_{glob} c \mathbf{V} \end{array} \right. \quad (2.29b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial \varepsilon_\sigma}{\partial t} + \operatorname{div} \mathbf{F}_\sigma(\varepsilon_\sigma) = \left( \frac{c}{c + \eta \varepsilon_\sigma} - \widehat{R}_d \right) \varepsilon_\sigma \end{array} \right. \quad (2.30a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \mathbf{F}_\sigma(\varepsilon_\sigma) = - \widehat{D}_{cell} \boldsymbol{\nabla} \varepsilon_\sigma \end{array} \right. \quad (2.30b)$$

dove sono stati introdotti i seguenti coefficienti adimensionali:

$$\left\{ \begin{array}{l} Re := \frac{\bar{v} \bar{x}}{\nu_\beta}, \quad Da := \frac{K_p}{\bar{x}^2}, \quad Pe_{glob} := \frac{\bar{v} \bar{x}}{D_\beta^{nutr}} \\ \delta_V := \frac{\bar{x} / \bar{t}}{\bar{v}}, \quad \delta_D := \frac{\bar{x}^2 / D_\beta^{nutr}}{\bar{t}} \end{array} \right.$$

I valori numerici dei coefficienti di scaling sono:

$$\left\{ \begin{array}{l} \bar{v} = 5 \times 10^{-3} [cm/s] \\ \bar{x} = 0.3 [cm] \\ \rho_\beta = 1 [g/cm^3], \mu_\beta = 8.2 \times 10^{-3} [g/cm.s] \Rightarrow \nu_\beta = 8.2 \times 10^{-3} [1/cm^2.s] \\ K_p = 10^{-2} [cm^2] \\ R_g = 1.6 \times 10^{-5} [1/s] \\ D_\beta^{nutr} = 3.24 \times 10^{-5} [cm^2/s] \end{array} \right.$$

I corrispondenti coefficienti adimensionali del modello assumono i seguenti valori:

$$\left\{ \begin{array}{l} Re = 0.2, \quad Da = 0.1, \quad Pe_{glob} = 150 \\ \delta_V = 10^{-3}, \quad \delta_D = 5 \times 10^{-2} \end{array} \right.$$

da cui risulta che è possibile trascurare nelle equazioni di Navier-Stokes i termini convettivi e assumere il fluido incomprimibile, ottenendo il seguente sistema differenziale semplificato che costituisce il modello per la crescita del costruito cellulare nello scaffold:

$$\left\{ \begin{array}{l} div \mathbf{V} = 0 \end{array} \right. \quad (2.31a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} div \mathbf{T}(\mathbf{V}, p) - \chi^{-1} \mathbf{V} = \mathbf{0} \end{array} \right. \quad (2.31b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \delta_D \frac{\partial}{\partial t} [(\varepsilon_\beta + K_{eq} \varepsilon_\sigma) c] + div \mathbf{J}(c, \mathbf{V}) = -\frac{\hat{R}_m c}{c + \hat{K}_m} \varepsilon_\sigma \end{array} \right. \quad (2.32a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \mathbf{J}(c, \mathbf{V}) = -\hat{D}_{eff}^{nutr}(\varepsilon_\beta) \nabla c + Pe_{glob} c \mathbf{V} \end{array} \right. \quad (2.32b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial \varepsilon_\sigma}{\partial t} + div \mathbf{F}_\sigma(\varepsilon_\sigma) = \left( \frac{c}{c + \eta \varepsilon_\sigma} - \hat{R}_d \right) \varepsilon_\sigma \end{array} \right. \quad (2.33a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \mathbf{F}_\sigma(\varepsilon_\sigma) = -\hat{D}_{cell} \nabla \varepsilon_\sigma \end{array} \right. \quad (2.33b)$$

# Capitolo 3

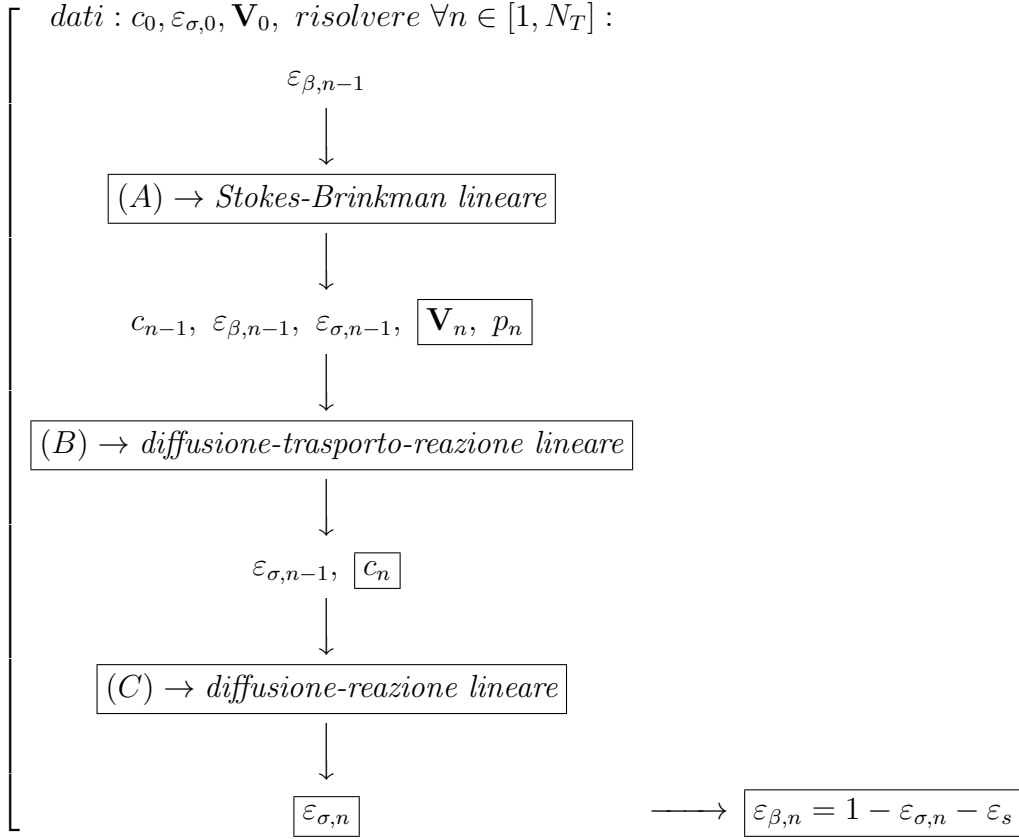
## Il Modello Numerico

In questo capitolo illustriamo l'algoritmo iterativo a blocchi per la linearizzazione del modello (2.31a)-(2.33b) e la relativa approssimazione ad elementi finiti dei sottoproblemi differenziali da risolvere ad ogni livello di avanzamento temporale. Il modello numerico proposto viene infine validato su casi test di interesse significativo nelle applicazioni di Ingegneria dei Tessuti.

### 3.1 L'approssimazione numerica

Il sistema (2.31a)-(2.33b) costituisce un problema al contorno e ai valori iniziali non lineare in cui i tre modelli per il fluido, il nutriente e le cellule risultano fortemente accoppiati. Abbiamo scelto di risolvere questi problemi attraverso un *metodo di Gauss-Seidel a blocchi* [66]: partendo da tre valori assegnati per le tre incognite del problema, si risolvono in successione tre sotto-problemi differenziali, dove per ciascun problema si risolve solo la variabile associata e si mantengono fisse le altre due. Riportiamo uno schema a blocchi dell'algoritmo di risoluzione dove l'intervallo temporale  $[0, T_{fin}]$  viene

diviso in  $N_T$  intervalli uniformi di passo  $\Delta t = T_{fin}/N_T$  con  $N_T \geq 1$ . L'analisi svolta in [67] dimostra che il passo temporale adottato per il presente schema di avanzamento temporale soddisfa ampiamente la condizione di assoluta stabilità.



In ciascuno dei tre blocchi (A), (B) e (C) abbiamo le seguenti equazioni:

$$\begin{cases} \operatorname{div} \mathbf{V} = 0 \end{cases} \quad (3.1a)$$

$$\begin{cases} \operatorname{div} \mathbf{T}(\mathbf{V}, p) - \chi^{-1}(\varepsilon_{\beta}(\mathbf{x}, t_{n-1})) \mathbf{V} = \mathbf{0} \end{cases} \quad (3.1b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\delta_D [(\varepsilon_\beta(\mathbf{x}, t_{n-1}) + K_{eq}\varepsilon_\sigma(\mathbf{x}, t_{n-1}))c]}{\Delta t} + \mathit{div}\mathbf{J}(c, \mathbf{V}(\mathbf{x}, t_n)) + \\ + \frac{\widehat{R}_m\varepsilon_\sigma(\mathbf{x}, t_{n-1})c}{c(\mathbf{x}, t_{n-1}) + \widehat{K}_m} = \frac{\delta_D [(\varepsilon_\beta(\mathbf{x}, t_{n-1}) + K_{eq}\varepsilon_\sigma(\mathbf{x}, t_{n-1}))c(\mathbf{x}, t_{n-1})]}{\Delta t} \end{array} \right. \quad (3.2)$$

$$\frac{\varepsilon_\sigma}{\Delta t} + \mathit{div}\mathbf{F}_\sigma(\varepsilon_\sigma) + \widehat{R}_d\varepsilon_\sigma = \frac{\varepsilon_\sigma(\mathbf{x}, t_{n-1})}{\Delta t} + \frac{c(\mathbf{x}, t_n)\varepsilon_\sigma(\mathbf{x}, t_{n-1})}{c(\mathbf{x}, t_n) + \eta\varepsilon_\sigma(\mathbf{x}, t_{n-1})} \quad (3.3)$$

Lo schema iterativo di avanzamento temporale viene inizializzato con tre valori per le incognite:  $\varepsilon_{\beta,0}$ ,  $c_0$  e  $\mathbf{v}_0$ . Il blocco di Stokes-Brinkman calcola la velocità del fluido, questa dipende però dall'incognita  $\varepsilon_\beta$ , che all'interno di tale blocco è posta uguale al valore che aveva al passo temporale precedente (cioè  $\varepsilon_\beta(\mathbf{x}, t_{n-1})$ ). Risolto il blocco di Stokes-Brinkman avremo ottenuto la velocità all'istante corrente,  $\mathbf{v}(\mathbf{x}, t_n)$ . Entrando nel blocco del bilancio del nutriente avremo fissate le incognite  $\mathbf{v}(\mathbf{x}, t_n)$  e ancora  $\varepsilon_\beta(\mathbf{x}, t_{n-1})$  e andremo a risolvere l'equazione per ottenere  $c(\mathbf{x}, t_n)$ . A questo punto possiamo entrare nell'ultimo blocco, dove avremo fissato la grandezza  $c(\mathbf{x}, t_n)$ ; nell'equazione della crescita cellulare non entra in gioco la velocità direttamente. Risolvendo l'equazione otterremo  $\varepsilon_\sigma(\mathbf{x}, t_n)$ . Utilizzando la relazione  $\varepsilon_\beta + \varepsilon_\sigma + \varepsilon_s = 1$  otteniamo immediatamente  $\varepsilon_\beta(\mathbf{x}, t_n)$  per poter re-inizializzare il ciclo temporale. Siamo ora nella condizione di risolvere tre problemi disaccoppiati, in cui notiamo che il blocco (A) è un problema di Stokes generalizzato mentre i rimanenti blocchi (B) e (C) sono casi particolari di un problema lineare di diffusione-trasporto-reazione. Utilizzeremo i metodi numerici noti in letteratura per la soluzione di questi due tipi di problemi [68], passeremo quindi dalla forma debole del problema per pervenire ad una descrizione matriciale dei sistemi in esame. Ricordiamo che per l'approssimazione numerica utilizzeremo polinomi di grado 1 per le incognite  $\varepsilon_\sigma$  e  $c$ , mentre useremo la coppia  $(\mathbb{P}_2, \mathbb{P}_1)$  (elementi di Taylor-Hood) per l'approssimazione della



coppia velocità-pressione nel problema di Stokes generalizzato. Tale coppia garantisce stabilità nella risoluzione numerica del problema fluido, evitando l'insorgere di modi spuri di pressione. Inoltre, per il problema lineare di diffusione-reazione-trasporto, all'interno del codice sono previsti metodi di stabilizzazione per il termine di trasporto e di lumping per il termine reattivo. Tutti questi accorgimenti permettono di pervenire ad uno schema numerico che preserva la positività della soluzione per le incognite  $c$  e  $\varepsilon_\sigma$ ; tale caratteristica è irrinunciabile pensato che queste due grandezze possono assumere solo valori positivi nella realtà.

# Capitolo 4

## Simulazioni numeriche

In questa sezione andiamo a riportare tutti i risultati delle simulazioni effettuate con il nostro codice. La prima parte di queste simulazioni è volta alla validazione del codice attraverso un confronto coi risultati riportati in letteratura. Principalmente ci riferiremo all'articolo di C.A. Chung, C.W. Chen, C.P. Chen e C.S. Tseng [63]. Nella seconda parte proporremo un'analisi di sensitività del modello al variare della frazione volumetrica che rappresenta la matrice porosa.

Il problema che andiamo a simulare modella l'evoluzione della biomassa all'interno dello scaffold, il consumo del nutriente presente nel fluido e il campo di moto di tale fluido. Vogliamo quindi studiare il legame tra la concentrazione di nutriente  $c$ , la frazione volumetrica di biomassa  $\varepsilon_\sigma$  e il campo di moto.

### 4.1 La validazione del codice numerico

In Figura 4.1 riportiamo ancora la schematizzazione geometrica dello scaffold. Mostriamo nel seguito i risultati delle nostre simulazioni atte alla vali-

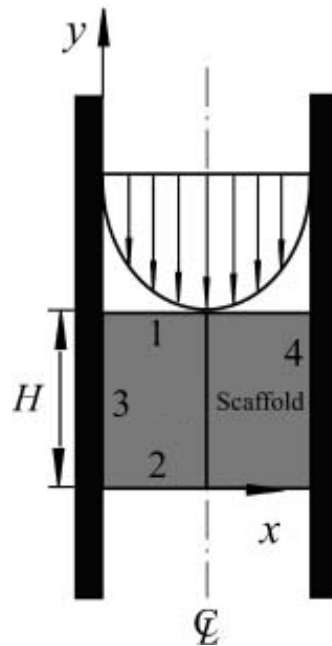


Figura 4.1: Rappresentazione schematica dello scaffold.

dazione del codice rispetto a risultati già presenti in letteratura [63]. Come si evince dalle figure 4.2 e 4.3, la concentrazione presenta una stratificazione all'interno del costruito cellulare. All'ingresso dello scaffold abbiamo la massima concentrazione di nutriente, questa poi si riduce all'interno dello scaffold coerentemente al consumo metabolico delle cellule. La frazione di biomassa  $\varepsilon_\sigma$  è maggiore nella zona superiore e centrale dello scaffold in accordo col fatto che in questa regione la densità di nutriente è più elevata. Il valore minimo di frazione cellulare si trova negli angoli inferiori del costruito cellulare dove anche il nutriente è minore. In Figura 4.4 abbiamo riportato la componente verticale della velocità; ricordiamo che in ingresso abbiamo imposto un profilo verticale alla velocità, condizioni di aderenza sulle pareti verticali e flusso nullo in uscita. I nostri risultati sono in ottimo accordo con quelli presenti in letteratura [63]. In Figura 4.5 sono stati riportati i valori della concentrazione di nutriente e della frazione volumetrica cellulare valutate sul fondo dello scaffold. Per entrambe le distribuzioni i valori massimi sono assunti al centro dello scaffold, coerentemente a quando riportato nelle

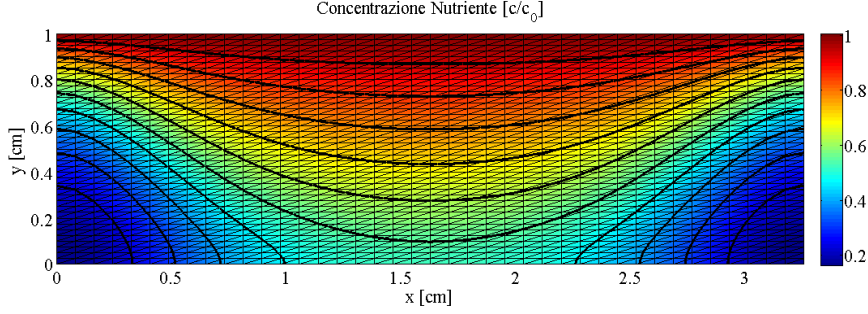


Figura 4.2: Concentrazione del nutriente  $c$  con velocità di perfusione pari a  $3.5 \mu\text{m}/\text{s}$  (corrispondente a  $Pe_{glob} \cong 10$ ) al tempo adimensionale  $t = 41.5$  (tempo reale 30 giorni).

figure 4.2 e 4.3. In Figura 4.6 riportiamo l'evoluzione della concentrazione media al variare del tasso di perfusione, e quindi del numero di Péclet. La concentrazione media nello scaffold è definita come:

$$\varepsilon_{\sigma,avg} = \frac{\int_{x=0}^W \int_{y=0}^H \varepsilon_{\sigma} dx dy}{\int_{x=0}^W \int_{y=0}^H dx dy}$$

Questa quantità media ottenuta mediando la frazione volumetrica di cellule all'interno del costruito cellulare viene adottata per ottenere un risultato condensato. Il caso in cui  $Pe_{glob} = 0$  può essere visto come la simulazione di una coltura statica. Come mostrato in Figura 4.6, una coltura statica aumenta il numero di cellule in maniera più limitata rispetto al caso della coltura dinamica. Questo indica che effettivamente la perfusione diretta di nutriente all'interno dello scaffold è un metodo di coltura più efficiente. Le presenti simulazioni mostrano un aumento monotono della crescita della biomassa all'aumentare della perfusione. Esperimenti in letteratura mostrano però che il flusso di fluido può produrre la necrosi delle cellule se lo sforzo indotto dal fluido è troppo grande [69]. Dato che nel nostro modello non viene incorporato un termine per la necrosi, la perfusione può solo aumentare

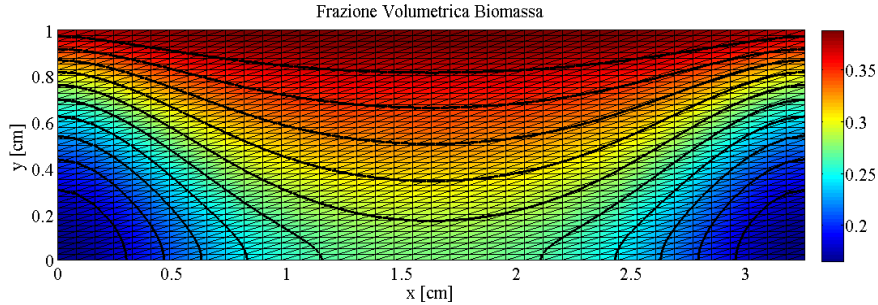


Figura 4.3: Frazione volumetrica di biomassa  $\varepsilon_\sigma$  con velocità di perfusione pari a  $3.5 \mu\text{m}/\text{s}$  (corrispondente a  $Pe_{glob} \cong 10$ ) al tempo adimensionale  $t = 41.5$  (tempo reale 30 giorni).

la crescita cellulare nelle nostre simulazioni. I profili della concentrazione di nutriente al variare del tasso di perfusione sono mostrati in Figura 4.7 e 4.8. I valori riportati sono quelli valutati lungo la linea mediana del costrutto cellulare per valori del numero di Péclet pari a 0 (coltura statica) e 100. In tutti i test in cui si è simulata un coltura statica sono state poste, sulla sezione di ingresso e di uscita dello scaffold, condizioni di Dirichlet pari a  $c_0$ . Simuliamo quindi la presenza di due serbatoi di nutriente posti in collegamento diretto con lo scaffold. L'evoluzione del nutriente è valutata su di un periodo di 30 giorni. Il nutriente viene consumato dalle cellule presenti nello scaffold e ciò è evidente dal grafico riportato. Nei primi giorni di coltura il consumo di nutriente è basso in quanto il numero di cellule iniziali è talmente basso che l'approvvigionamento di nutriente da parte del fluido in ingresso copre parte del consumo. In questo caso è presente una marcata simmetria verticale all'interno del costrutto cellulare per quanto riguarda il consumo di nutriente. Quando invece si attiva la perfusione, Figura 4.8, non siamo più in presenza di simmetria nel consumo di nutriente; la concentrazione di nutriente diminuisce lungo la linea mediana del costrutto. Notiamo inoltre i valori minimi di nutriente riportati nei grafici. Quando la perfusione non è attiva, alla fine della coltura (30esimo giorno) la concentrazione di nutriente adimensionale

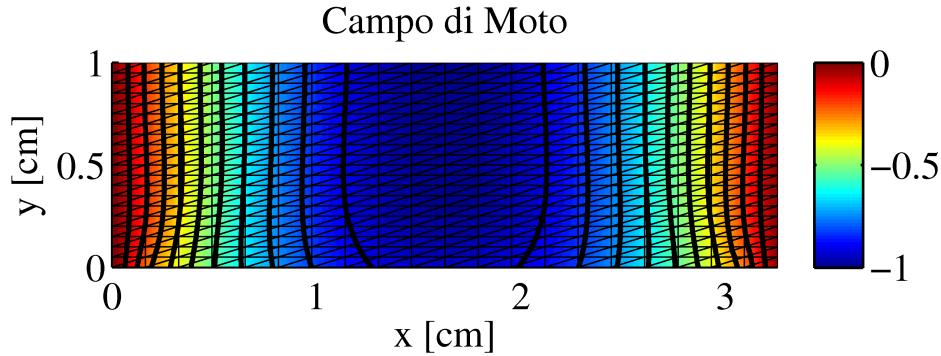


Figura 4.4: Campo di moto (componente verticale) con velocità di perfusione pari a  $3.5 \mu\text{m/s}$  (corrispondente a  $Pe_{glob} \cong 10$ ) al tempo adimensionale  $t = 41.5$  (tempo reale 30 giorni).

è pari a 0.3. Quando invece il costrutto è sottoposto a perfusione, la concentrazione di nutriente alla fine della simulazione è pari a circa 0.94, in accordo col fatto che il trasporto migliora l'apporto di nutriente anche all'interno del costrutto. Analogamente a quanto fatto per la concentrazione di nutriente, in Figura 4.9 e 4.10 riportiamo l'evoluzione della frazione volumetrica  $\varepsilon_\sigma$  lungo la linea mediana dello scaffold per i valori di perfusione corrispondenti a  $Pe_{glob} = 0$  (coltura statica) e  $Pe_{glob} = 100$ . Come per il nutriente, la mancanza di perfusione provoca una crescita simmetrica delle cellule lungo la linea mediana del costrutto. Quando si attiva la perfusione la crescita cellulare risulta asimmetrica lungo la linea centrale dello scaffold. Notiamo inoltre come la crescita della biomassa sia più omogenea anche all'interno del costrutto. In Figura 4.11 abbiamo riportato l'andamento della frazione cellulare media, all'istante finale (30esimo giorno), al variare del numero di Péclet globale. La crescita cellulare complessiva aumenta all'aumentare del tasso di perfusione, che è legato al numero di Péclet, fino a raggiungere un valore asintotico. Chiamiamo questo valore asintotico *limite di nutrimento uniforme*, dato che è quello che si potrebbe ottenere ponendo la concentrazione di nutriente costante su tutto lo scaffold e pari valore di concentrazione

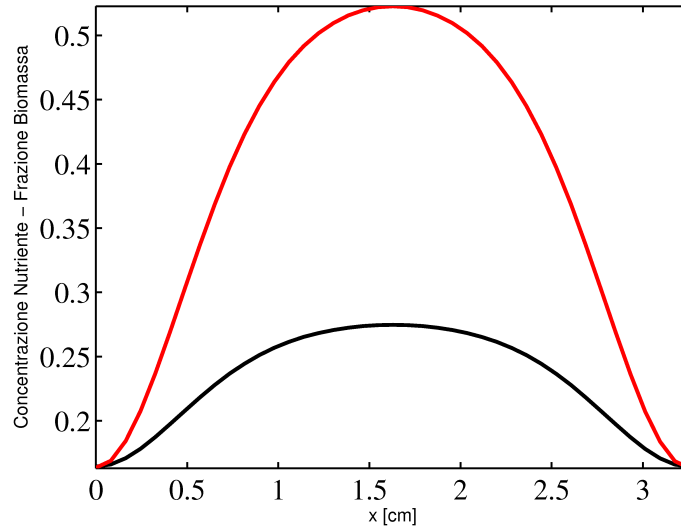


Figura 4.5: Visualizzazione della concentrazione di nutriente  $c$  (in rosso) e della frazione di cellule  $\varepsilon_\sigma$  (in nero) con velocità di perfusione di  $3.5 \mu\text{m}/\text{s}$  (corrispondente a  $Pe_{glob} \cong 10$ ) al tempo  $t = 41.5$  (tempo reale 30 giorni).

all'interno del serbatoio di alimentazione del bioreattore.

## 4.2 Analisi di sensitività

A livello di frazioni volumetriche, il nostro scaffold è formato da una parte fluida, una cellulare e dalla matrice porosa dove attecchiscono le cellule ed al cui interno scorre il fluido nutriente. Queste grandezze sono legate dalla relazione  $\varepsilon_\beta + \varepsilon_\sigma + \varepsilon_s = 1$ . Il valore  $\varepsilon_s$ , che rappresenta la porzione di matrice porosa, è un valore fisso nel tempo e nello spazio. Per ipotesi infatti si è deciso che nei tempi caratteristici considerati nel nostro modello la matrice porosa non degradi, sebbene nella realtà questo fenomeno sia presente. Quello che varia sono dunque  $\varepsilon_\beta$  ed  $\varepsilon_\sigma$ . Abbiamo quindi voluto fare simulazioni al variare del parametro  $\varepsilon_s$  per vedere come cambia la crescita cellulare e

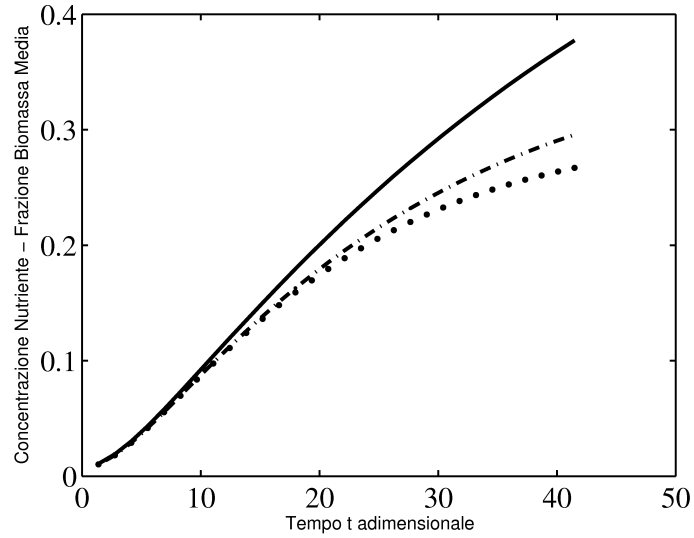


Figura 4.6: Evoluzione temporale della frazione cellulare media  $\varepsilon_{\sigma,avg}$  per valori di perfusione corrispondenti a  $Pe_{glob} = 0$  (linea continua), 10 (linea tratto-punto), 100 (linea punteggiata) fino al tempo  $t = 41.5$  (tempo reale 30 giorni)

la distribuzione di concentrazione di nutriente. In particolare abbiamo modellato una matrice porosa la cui micro-struttura è riportata in Figura 4.12. Dobbiamo quindi parametrizzare la frazione volumetrica occupata dalla matrice porosa:  $\varepsilon_{\sigma}$ . Tale grandezza è il rapporto tra il volume della matrice  $V_{scaff}$  e il volume totale  $V$ . In Figura 4.13 riportiamo la sezione della struttura porosa in esame e le grandezze geometriche usate nei seguenti calcoli.



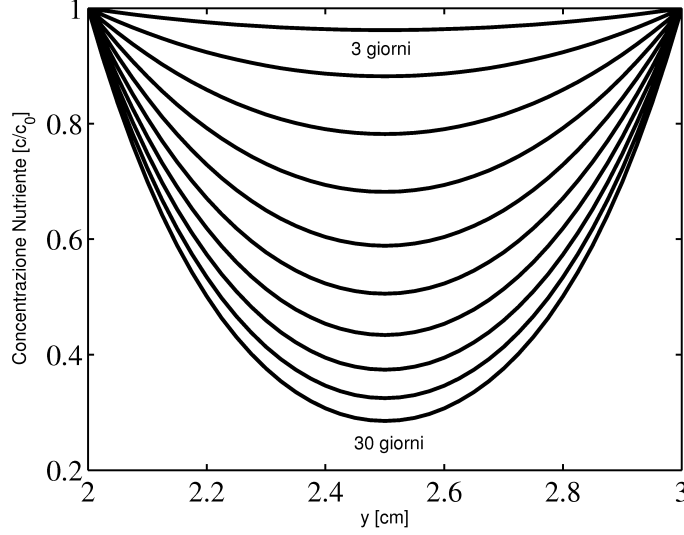


Figura 4.7: Evoluzione temporale della concentrazione di nutriente  $c$  lungo la linea centrale dello scaffold in assenza di perfusione,  $Pe_{glob} = 0$ . Tempo finale  $t = 41.5$  (30 giorni).

$$\varepsilon_{\sigma} = \frac{V_{scaff}}{V}, \quad V = H^3, \quad V_{scaff} = H^3 - (V_{sfera} - 6 \cdot V_{calotta})$$

$$V_{sfera} = \frac{4}{3} \pi R^3, \quad V_{calotta} = \frac{\pi}{3} h^2 (3R - h)$$

$$h = R - \frac{H}{2}, \quad \frac{H}{2} < R < \frac{H}{2} \sqrt{2}$$

$$\varepsilon_{scaff} = \frac{H^3 - \frac{\pi}{3} (4R^3 - 6h^2 (3R - h))}{H^3} = 1 - \frac{\pi}{3H^3} \left( -8R^3 + 9R^2 H - \frac{3}{4} H^3 \right)$$

$$\lambda := \frac{R}{H/2}, \quad \lambda \geq 1$$

$$\varepsilon_{scaff}(\lambda) = \left( 1 + \frac{\pi}{4} \right) + \frac{\pi}{3} \lambda^3 - \frac{3\pi}{4} \lambda^2$$

Abbiamo quindi trovato il legame tra le grandezze geometriche che descrivono la struttura porosa ( $\lambda$ ) e la grandezza di interesse in questo studio di sensitività ( $\varepsilon_{scaff}$ ). In Figura 4.14 e 4.15 riportiamo i grafici, al tempo finale  $T_{fin} = 60$  *giorni*, della concentrazione di nutriente e della frazione volumetriche di cellule. Come è ragionevole aspettarsi, all'aumentare della frazione occupata dallo scaffold, lo spazio libero per la crescita della biomassa e per

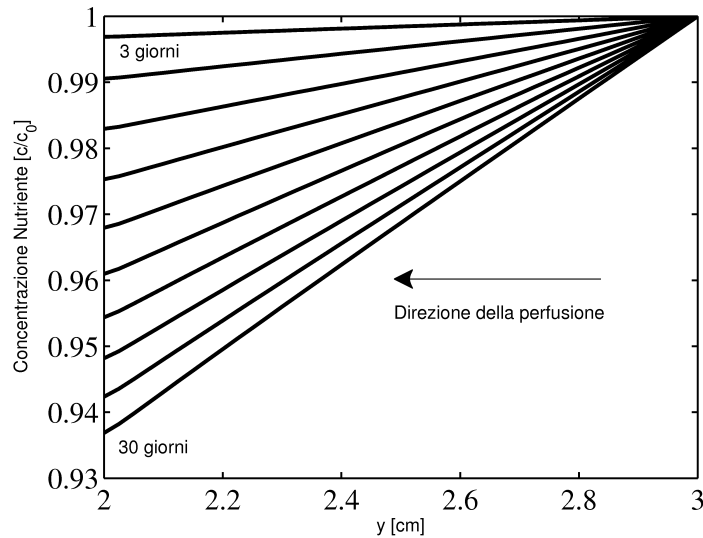


Figura 4.8: Evoluzione temporale della concentrazione di nutriente  $c$  lungo la linea centrale dello scaffold con velocità di perfusione pari a  $3.5 \mu\text{m/s}$  ( $Pe_{glob} = 10$ ). Tempo finale  $t = 41.5$  (30 giorni).

la circolazione del fluido nutriente diminuiscono. Di conseguenza sarà più difficile per il fluido raggiungere in profondità il costruito cellulare e quindi avremo una minore crescita cellulare. La diminuzione della concentrazione e della crescita di biomassa è ancora più evidente se andiamo a rappresentare i valori massimi, minimi e medi valutati all'interno del dominio di calcolo. Queste simulazioni confermano quanto già riportato nel primo capitolo di questo lavoro. Un bioreattore a perfusione diretta porta ad una migliore crescita cellulare proprio perchè attraverso il moto del fluido, il nutriente riesce a raggiungere le zone più interne della matrice porosa. Quando andiamo a diminuire la porosità della matrice, l'effetto perfusivo diminuisce e quindi anche la crescita in profondità delle cellule.

Questo tipo di descrizione permette di valutare diversi tipi di strutture matriciali in quanto non interessa conoscere la vera geometria della matrice porosa ma solo il suo volume rispetto a quello totale del costruito cellulare.

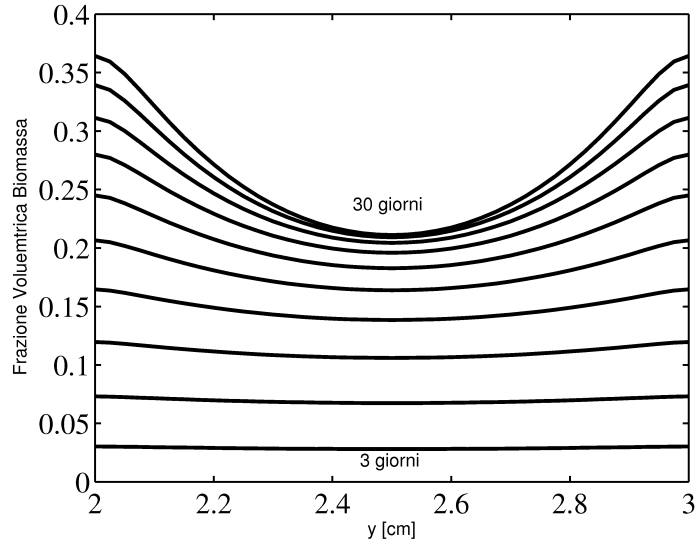


Figura 4.9: Evoluzione temporale della frazione volumetrica di cellule  $\varepsilon_\sigma$  lungo la linea centrale dello scaffold in assenza di perfusione,  $Pe_{glob} = 0$ . Tempo finale  $t = 41.5$  (30 giorni).

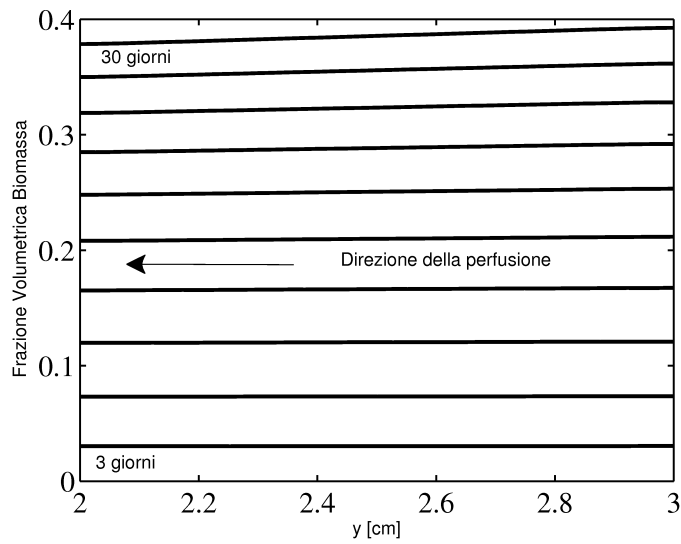


Figura 4.10: Evoluzione temporale della frazione volumetrica di cellule  $\varepsilon_\sigma$  lungo la linea centrale dello scaffold con velocità di perfusione pari a  $3.5 \mu m/s$  ( $Pe_{glob} = 10$ ). Tempo finale  $t = 41.5$  (30 giorni).

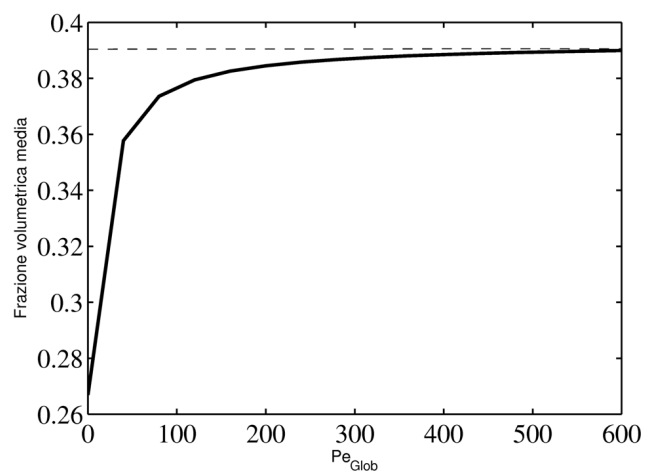


Figura 4.11: Variazione della frazione cellulare media  $\varepsilon_{\sigma,avg}$  valutata all'istante finale ( $t = 41.5$ , 30 giorni) in funzione del numero di Péclet.

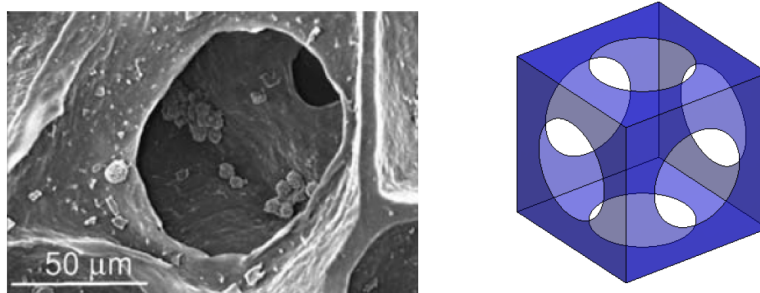


Figura 4.12: A sinistra un immagine al microscopio elettronico di una matrice porosa seminata con controciti delle articolazioni umane, a destra la geometria semplificata del poro.

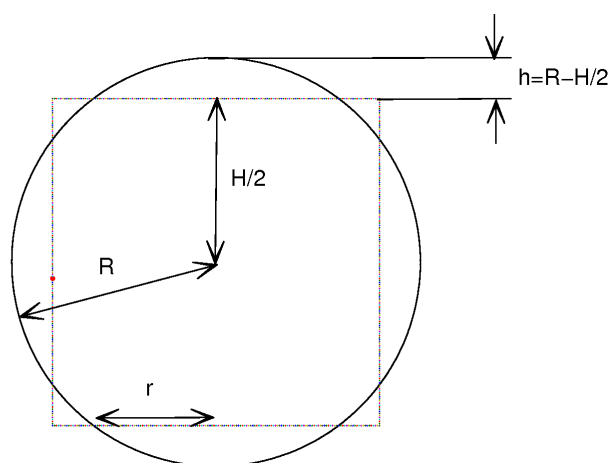


Figura 4.13: Sezione bidimensionale della struttura porosa in esame.

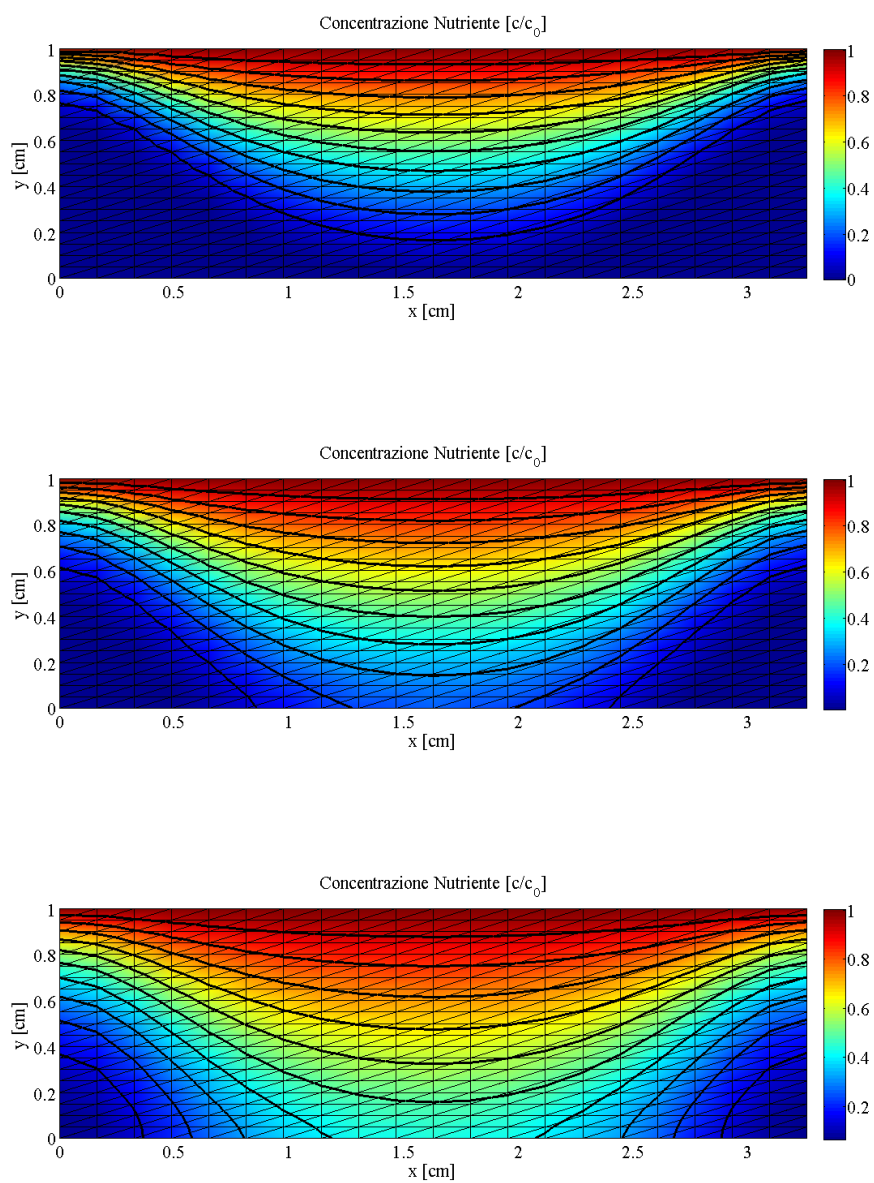


Figura 4.14: Concentrazione di nutriente al variare della frazione  $\varepsilon_{scaff}(\lambda)$ , per  $\lambda = \{1, 1.138, 1.345\}$ .

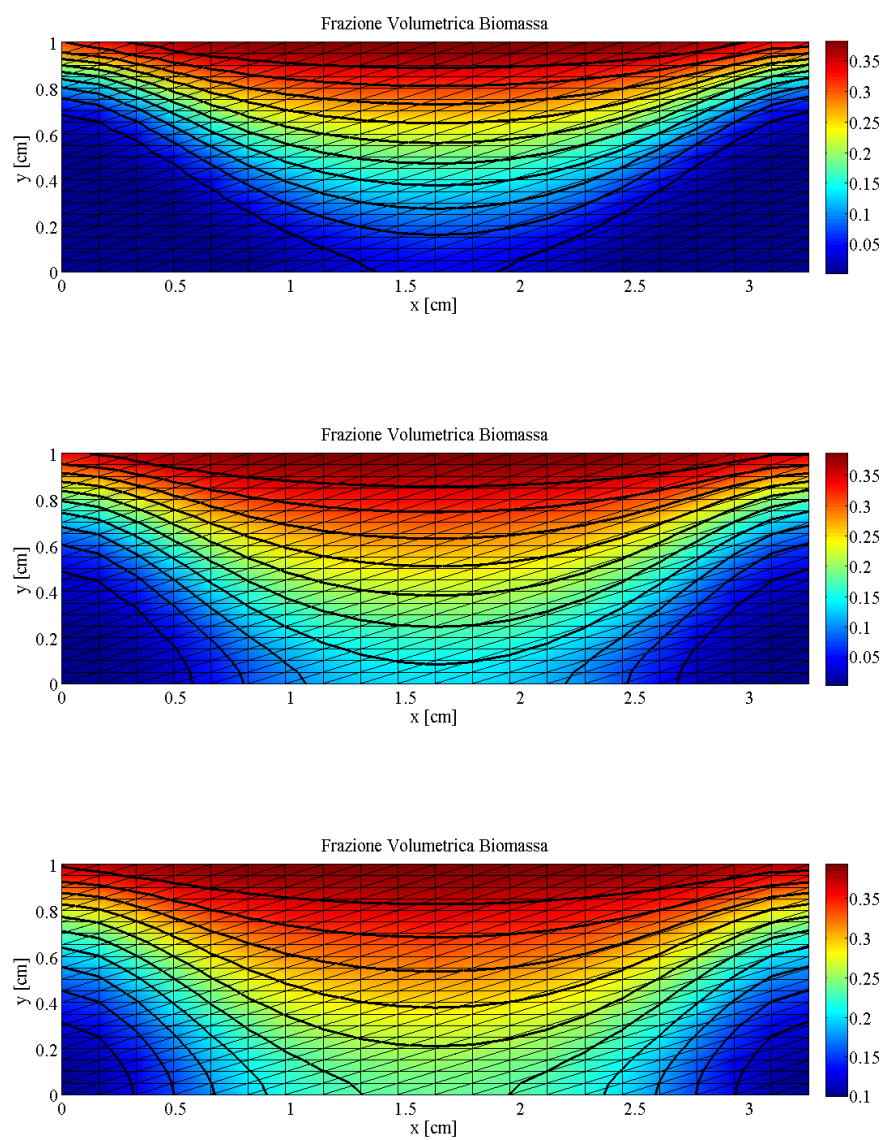


Figura 4.15: Frazione volumetrica della biomassa al variare della frazione  $\varepsilon_{scaff}(\lambda)$ , per  $\lambda = \{1, 1.138, 1.345\}$ .

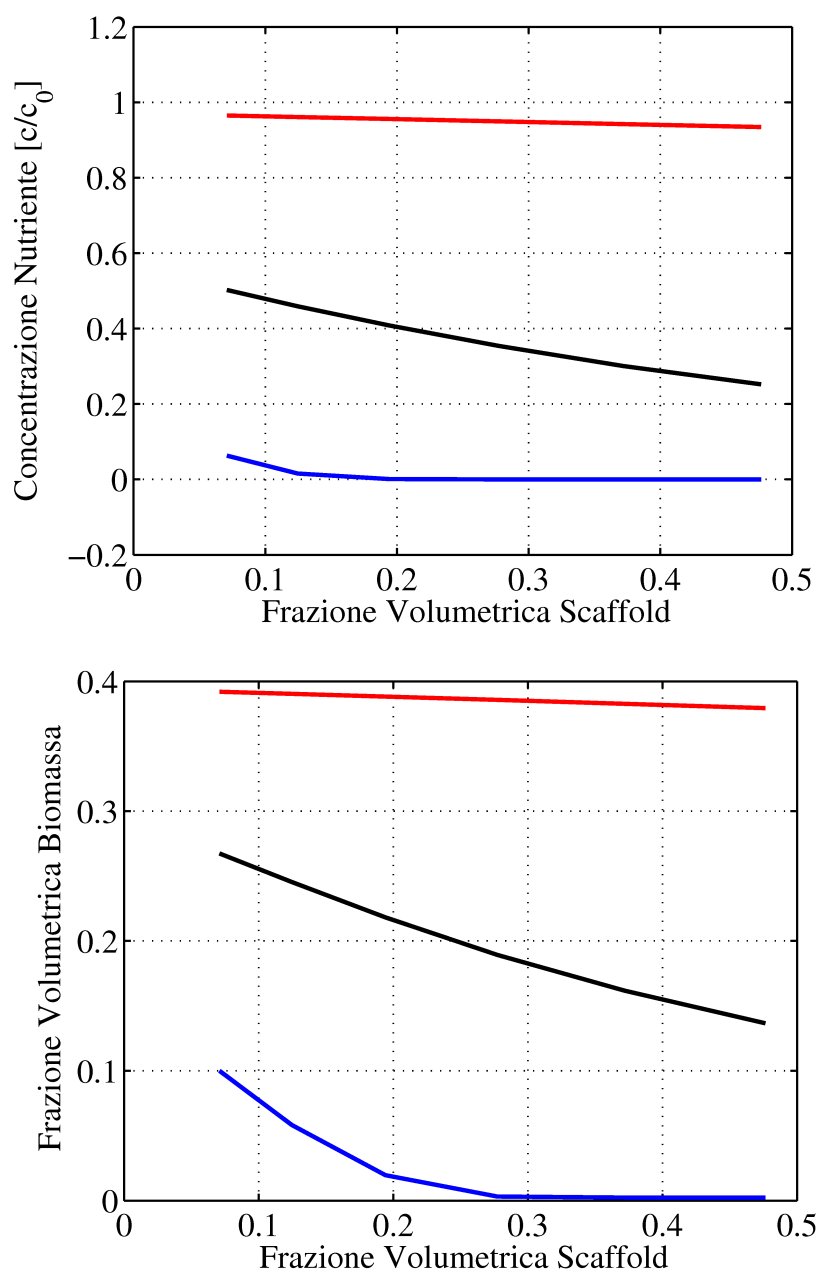


Figura 4.16: Valutazione del valore massimo (rosso), minimo (blu) e medio (nero) della frazione volumetrica delle cellule e della concentrazione di nutriente al variare della frazione  $\varepsilon_s$ .



# Conclusioni

In questo lavoro di tesi abbiamo affrontato lo studio matematico e numerico di un bioreattore in applicazioni di Ingegneria dei Tessuti. Studiando la fisica dei processi che avvengono al suo interno siamo riusciti a capire quali sono i limiti dei vari tipi di bioreattori studiati in letteratura. Di conseguenza abbiamo scelto di modellare un bioreattore a perfusione diretta in quanto è quello che presenta le migliori caratteristiche di efficienza nella semina e coltura delle cellule. Dopo aver scelto quali fenomeni fisici modellare e quali trascurare abbiamo costruito un modello matematico che descrive l'evoluzione della popolazione di cellule, del nutriente che viene irrorato nello scaffold e del fluido che trasporta tale nutriente. Un'analisi adimensionale del modello ottenuto ci ha permesso di arrivare ad una descrizione accurata ma più semplice del problema. Infine un algoritmo iterativo basato sul metodo di Gauss-Seidel a blocchi ha permesso di disaccoppiare il problema, pervenendo ad un algoritmo computazionale efficiente e stabile. Le successive simulazioni numeriche eseguite con un codice ad elementi finiti implementato in MATLAB® hanno consentito di validare il modello computazionale su casi test di significativo interesse. Un possibile sviluppo per questo lavoro di tesi è di includere nella modellazione geometrica del bioreattore le due sezioni fluide poste sopra e sotto il costrutto cellulare che simulano il collegamento del bioreattore con il circuito di alimentazione del fluido, in quanto nella versione attuale del modello tali sezioni sono descritte mediante semplici condizioni al contorno di ingresso e di uscita.

# Bibliografia

- [1] M. T. Raimondi, F. Boschetti, F. Migliavacca, M. Cioffi, and G. Dubini. Micro fluid dynamics in three-dimensional engineered cell systems in bioreactors. In N. Ashammakhi and R. L. Reis, editors, *Topics in Tissue Engineering*, volume 2, chapter 9. 2005.
- [2] R. Langer and J.P. Vacanti. Tissue engineering. *Science*, 260(5110):920–926, 1993.
- [3] D.L. Butler et al. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J. Biomech. Eng.*, 122:570–575, 2000.
- [4] G.V. Mazariegos et al. First clinical use of a novel bioartificial liver support system (blss). *Am. J. Transplant.*, 2:260–266, 2002.
- [5] L.G. Griffith and G. Naughton. Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities. *Science*, 295:1009–1014, 2002.
- [6] G. Vunjak-Novakovic et al. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol. Prog.*, 14:193–202, 1998.
- [7] L.E. Freed et al. Tissue engineering of cartilage in space. *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:13885–13890, 1997.
- [8] C.E. Holy et al. Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *J. Biomed. Mater. Res.*, 51:376–382, 2000.

- [9] R.L. Carrier et al. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol. Bioeng.*, 64:580–589, 1999.
- [10] L.E. Freed et al. Chondrogenesis in a cell-polymer bioreactor system. *Exp. Cell Res.*, 240:58–65, 1998.
- [11] S.L. Ishaug-Riley et al. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, 19:1405–1412, 1998.
- [12] B.S. Kim et al. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol. Bioeng.*, 57:46–54, 1998.
- [13] A. Bruinink et al. The stiffness of bone marrow cell-knit composites is increased during mechanical load. *Biomaterials*, 22:3169–3178, 2001.
- [14] Y. Li et al. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices. *Biotechnol. Prog.*, 17:935–944, 2001.
- [15] Y.L. Xiao et al. Static and dynamic fibroblast seeding and cultivation in porous peo/pbt scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 10:773–777, 1999.
- [16] K.J. Burg et al. Application of magnetic resonance microscopy to tissue engineering: a polylactide model. *J. Biomed. Mater. Res.*, 61:380–390, 2002.
- [17] R. Glicklis et al. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.*, 67:344–353, 2000.
- [18] S. Nehrer et al. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials*, 18:769–776, 1997.

- [19] G. Vunjak-Novakovic et al. Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage. *AIChE J.*, 42:850–860, 1996.
- [20] D. Wendt et al. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol. Bioeng.*, 84:205–214, 2003.
- [21] Y. Xie et al. Three-dimensional cel-scaffold constructs promote efficient gene transfection: implications for cell-based gene therapy. *Tissue Eng.*, 7:585–598, 2001.
- [22] R. Sodian et al. Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. *Tissue Eng.*, 8:863–870, 2002.
- [23] T. Davisson et al. Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures. *Tissue Eng.*, 8:807–816, 2002.
- [24] M. Radisic et al. High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.*, 82:403–414, 2003.
- [25] S.S. Kim et al. Dynamic seeding and *in vitro* culture of hepatocytes in a flow perfusion system. *Tissue Eng.*, 6:39–44, 2000.
- [26] R.M. Sutherland et al. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res.*, 46:5320–5329, 1986.
- [27] I. Martin et al. Method for quantitative analysis of glycosaminoglycan distribution in cultured natural and engineerd cartilage. *Ann. Biomed. Eng.*, 27:656–662, 1999.
- [28] S.L. Ishaug et al. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 36:17–28, 1997.
- [29] K.J. Gooch et al. Effects of mixing intensity on tissue-engineered cartilage. *Biotechnol. Bioeng.*, 72:402–407, 2001.

- [30] G. Vunjak-Novalovic et al. Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J. Orthop. Res.*, 17:130–138, 1999.
- [31] H.W. Rhee et al. Permanent phenotypic and genotypic changes of prostate cancer cells cultured in a three-dimensional rotating-wall vessel. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 37:127–140, 2001.
- [32] L.L. Licato et al. A novel preclinical model of human malignant melanoma utilizing bioreactor rotating-wall vessels. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 37:121–126, 2001.
- [33] M. Pei et al. Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineered scaffolds. *FASEB J.*, 16:1691–1694, 2002.
- [34] B.R. Unsworth and P.I. Lelkes. Growing tissues in microgravity. *Nat. Med.*, 4:901–907, 1998.
- [35] B. Obradovic et al. Integration of engineered cartilage. *J. Orthop. Res.*, 19:1089–1097, 2001.
- [36] G.N. Bancroft et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3d perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99:12600–12605, 2002.
- [37] A.S. Goldstein et al. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 22:1279–1288, 2001.
- [38] F.A. Navarro et al. Perfusion of medium improves growth of human oral neomucosal tissue constructs. *Wound Repair Regen.*, 9:507–512, 2001.
- [39] R.L. Carrier et al. Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle. *Tissue Eng.*, 8:175–188, 2002.

- [40] D. Pazzano et al. Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture. *Biotechnol. Prog.*, 16:893–896, 2000.
- [41] K.A. Williams et al. Computational fluid dynamics modeling of steady-state momentum and mass transport in a bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biotechnol. Prog.*, 18:951–963, 2002.
- [42] M.T. Raimondi et al. Mechanobiology of engineered cartilage cultured under aquantified fluid-dynamic environment. *Biomech. Model. Mechanobiol.*, 1:69–82, 2002.
- [43] M.V. Risbud and M. Sittinger. Tissue engineered: advances in *in vitro* cartilage generation. *Trends Biotechnol.*, 20:351–356, 2002.
- [44] M.E. Gomes et al. Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on strch-based three-dimensional scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 67A:87–95, 2003.
- [45] I. Zein et al. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineered applications. *Biomaterials*, 23:1169–1185, 2002.
- [46] T. Boland et al. Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat. Rec.*, 272A:497–502, 2003.
- [47] C.M. Begley and S.J. Kleis. The fluid dynamic and shear environment in the nasa/jsc rotating-wall perfused-vessel bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 70:32–40, 2000.
- [48] P. Sucusky et al. Fluid mechanics of a spinner-flask bioractor. *Biotechnol. Bioeng.*
- [49] B. Obradovic et al. Glycosaminoglycan deposition in engineered cartilage: experiments and mathematical model. *AIChE J.*, 46:1860–1871, 2000.

- [50] P. Akhyari et al. Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts. *Circulation*, 106:1137–1142, 2002.
- [51] C.A. Powell et al. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 283:C1557–C1565, 2002.
- [52] B.S. Kim et al. Cyclic mechanical strain regulates the development of engineered smooth muscle tissue. *Nat. Biotechnol.*, 17:979–983, 1999.
- [53] L.E. Niklason et al. Functional arteries grown *in vitro*. *Science*, 284:489–493, 1999.
- [54] T. Davisson et al. Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. *J. Orthop. Res.*, 20:842–848, 2002.
- [55] S.D. Waldman et al. Effect of biomechanical conditioning on cartilaginous tissue formation *in vitro*. *J. Bone Jt Surg. Am.*, 85A (Suppl. 2):101–105, 2003.
- [56] R.L. Mauck et al. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J. Biomech. Eng.*, 122:252–260, 2000.
- [57] G.H. Altman et al. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J.*, 16:270–272, 2002.
- [58] O. Dèmarteau et al. Development and validation of a bioreactor for physical stimulation of engineered cartilage. *Biorheology*, 40:331–336, 2003.
- [59] O. Dèmarteau et al. Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310:580–588, 2003.

- [60] Stephen Whitaker Brian D. Wood, Michel Quintard. Calculation of effective diffusivities for biofilms and tissues. *Biotechnology And Bioengineering*, 77(5), March 2002.
- [61] Stephen Whitaker. Flow in porous media i: A theoretical derivation of darcy's law. *Transport in Porous Media 1*, pages 3–25, 1986.
- [62] H. Beyenal et al. Measurement of local effective diffusivity in heterogeneous biofilms. *Water Sci Technol*, 38:171–178, 1998.
- [63] C.P. Chen C.S. Tseng C.A. Chung, C.W. Chen. Enhancement of cell growth in tissue-engineering constructs under direct perfusion: Modeling and simulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(6):1603–1616, August 15 2007.
- [64] S. Whitaker. *The method of volume averaging. Theory and application of transport in porous media*. Kluwer Academic Publishers, 1999.
- [65] DE. Contois. Kinetics of bacterial growth: Relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. *J Gen Microbil*, (21):40–50, 1959.
- [66] J.W. Jerome. *Analysis of Charge Transport*. Springer, New York, 1996.
- [67] Paolo Zunino Manuela T. Raimondi Riccardo Sacco, Paola Causin. A multiohysics/multiscale 2d numerical simulation of scaffold-based cartilage regeneration under interstitial perfusion in a bioreactor. *Biomech Model Mechanobiol*, 2010.
- [68] A. Quarteroni. *Modellistica Numerica per Problemi Differenziali*. Springer, Milano, Italia, 2003.
- [69] Garcia AJ Guldberg RE Cartmell SH, Porter BD. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs *in vitro*. *Tissue Eng*, (9):1197–1203, 2003.