

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Biomeccanica e Biomateriali



Sferoide tumorale: il link tra meccanica e crescita

Relatore: *Prof. Davide Carlo Ambrosi*

Autore: *Veronica Sicuro*

Matricola: *817270*

Anno Accademico 2014/2015

Indice

Sommario	4
Summary	6
1. Introduzione e stato dell'arte	8
1.1. Lo sferoide tumorale	8
1.2. Primi esperimenti	9
1.3. Stylianopoulos: gli sforzi residui	10
1.4. Montel et al.: gli stress osmotici	12
2. Materiali e metodi	17
2.1. Proprietà meccaniche e caratteristiche reologiche dello sferoide tumorale	17
2.2. Software per le simulazioni	18
2.3. Modelli matematici	18
2.3.1. Modello fluido	18
2.3.2. Modello solido elastico lineare.....	19
2.3.3. Modello poroelastico	26
2.4. Metodi numerici	28
2.4.1. Schema centrato	28
2.4.2. Metodi Eulero in avanti/Eulero all'indietro	29
2.4.3. Schema decentrato	31
2.5. Elementi di poroelasticità e di biofisica cellulare	32
2.5.1. Principio di Von Terzaghi	32

2.5.2. Pressione osmotica.....	33
2.5.3. Leggi di crescita.....	35
3. Il modello numerico.....	36
3.1. Caso φ_s costante.....	36
3.2. Caso $\varphi_s(\mathbf{r})$ non omogeneo.....	37
3.3. Porosità che evolve nel tempo.....	42
3.4. Evoluzione del volume nel tempo	43
4. Risultati e discussione	45
4.1. Disomogeneità radiale della frazione volumetrica $\varphi_s(\mathbf{r})$	46
4.2. Evoluzione temporale: carico esterno pari a 1 KPa	48
4.3. Evoluzione temporale: carico esterno nullo.....	55
4.4. Evoluzione temporale: carico esterno pari a 10 KPa.....	57
4.5. Confronto	60
4.6. Confronto caso lineare VS costante	63
5. Conclusioni.....	66
Appendice	69
Bibliografia.....	84

Sommario

Questa tesi è dedicata allo studio di un modello matematico che descriva l'accoppiamento tra crescita e meccanica di uno sferoide tumorale.

Nello studio in vitro dei tumori talvolta non viene analizzata la singola cellula, ma lo sferoide tumorale multicellulare, ossia un agglomerato di cellule tumorali inizialmente formato attraverso opportune tecniche (agitazione delle cellule in soluzione, deposizione su superfici concave non adesive, ecc.) atte a promuovere l'aggregazione cellulare vincendo le interazioni superficiali cellula-cellula.

In alcuni recenti esperimenti (Montel et al.), sono state osservate le velocità di crescita e la struttura interna di uno sferoide tumorale immerso in una soluzione con grande disponibilità di nutrienti e sottoposto ad un carico esterno; tale carico è generato da una differenza di pressione osmotica tra l'interno e l'esterno, dovuta alla presenza di un soluto (destrano) con molecole di grossa dimensione, più grandi degli interstizi cellulari e pertanto incapaci di penetrare all'interno dello sferoide. In accordo con alcuni studi precedenti (Helmlinger et al.), ottenuti ponendo l'aggregato cellulare in un gel con proprietà meccaniche controllate, il risultato osservato è una disomogeneità nell'andamento della crescita tra la periferia e l'interno dello sferoide; in particolare, è stato individuato un aumento dell'apoptosi cellulare nella zona centrale ed un'invariata mitosi alla periferia dello sferoide.

Un altro aspetto osservato sperimentalmente è la variazione dell'andamento della crescita del diametro in funzione del carico imposto; è stata riportata una riduzione della velocità di crescita e quindi delle dimensioni finali raggiunte dallo sferoide, all'aumentare del modulo del carico esterno imposto.

Obiettivo di questa tesi è riprodurre i risultati sperimentali sulla base di un modello teorico. Il modello scelto per caratterizzare questi fenomeni è quello di un materiale poroelastico bifase, dove lo sferoide tumorale è rappresentato come una miscela costituita da una parte solida elastica (le cellule) ed un fluido che riempie gli spazi intercellulari.

A partire dagli esperimenti citati, si sono effettuate simulazioni numeriche, tramite un codice alle differenze finite opportunamente implementato, atte a mimare il comportamento meccanico dello sferoide sottoposto ad un carico esterno.

Le simulazioni sono state effettuate per gli stessi valori di carico riportati in letteratura, confrontandole in particolare con il caso di uno sferoide non caricato. In quest'ultimo caso si è osservata sperimentalmente una crescita esponenziale finché il nutriente penetra con una concentrazione sufficientemente grande sino al centro dell'aggregato cellulare.

I risultati ottenuti riproducono qualitativamente alcuni aspetti degli esperimenti in letteratura presi come riferimento, evidenziando in particolare:

- la **disomogeneità** tra il centro e la periferia dello sferoide, sia in termini di sforzo, maggiore in modulo al centro, che di frazione volumetrica solida presente, maggiore alla periferia;
- l'**influenza** dell'entità **del carico esterno** imposto sull'andamento della crescita dello sferoide; nello specifico si ottiene velocità di crescita massima nel caso di sferoide scarico e minima nel caso di sferoide caricato con 20 KPa.

Il modello sviluppato ed implementato numericamente cattura alcune caratteristiche della meccanica dello sferoide tumorale, in quanto ne riporta correttamente le proprietà meccaniche e riproduce qualitativamente alcuni risultati ottenuti sperimentalmente in vitro.

Summary

This thesis work consists in the study of a mathematical model that describes the link between growing and mechanics of tumor spheroids.

Sometimes single tumor cells are not used in the in vitro study of tumors, but the object of analysis is the tumor spheroid instead, which is a tumor cells agglomerate created through different techniques (agitation in solution, sedimentation on concave non-adhesive surfaces, etc.), which have all the aim to promote cellular aggregation winning the surface interactions between cells.

In some recent experiments found in literature (Montel et al.), growing velocity and internal structure have been observed in a tumor spheroid in solution with high availability of nutrients; spheroid is loaded through an osmotic pressure difference between the internal and the external, due to the presence of a solute (dextran) made of macromolecules, bigger than the cellular interstitial spaces and so unable to penetrate the spheroid. In according to previous experiments (Helmlinger et al.), where the spheroid was put inside a gel solution with controlled mechanical properties, it has been observed an inhomogeneity of growing between the periphery and the internal part of the spheroid; in particular, what they found is an increasing of apoptosis in the central area, accompanied by invariant mitosis at the periphery.

Another aspect that has been observed is the influence of external load on the growing trend of the diameter; what is reported is a reduction of the growing velocity, and so of the final dimensions of the spheroid as a consequence of the increasing of the absolute value of the external load imposed.

The aim of this work is reproducing the experimental results through a theoretical model. The chosen model to characterize these phenomena is a biphasic poroelastic material, where the tumor spheroid is a blending composed of a solid elastic part (the cells) and a fluid filling the intercellular space.

Taking into account the experiments, we made some numerical simulations through a finite difference code personally implemented, trying to mimic the mechanical behavior of the spheroid when it is externally loaded.

Simulations have been made for the load values found in literature, in particular confronting them with the unloaded spheroid condition. In this case, an exponential growth was experimentally observed, until nutrients penetrate in a concentration that allows them to reach the central part of the cellular aggregate.

Results qualitatively mimic some aspects of the experiments found in literature, evidencing:

- a *inhomogeneity* between the center and the periphery both in terms of stress, higher in modulus at the center, and in terms of solid volumetric fraction, higher in the periphery;
- the *influence of imposed external load* on the growing of the spheroid; more precisely it has been obtained a maximum growing velocity in the unloaded spheroid situation and a minimum in velocity in case of a 20 KPa load.

So, we can say that the model implemented captures some characteristics of the mechanics of the tumor spheroid and it qualitatively reproduces some results obtained through in vitro experiments.

1. Introduzione e stato dell'arte

In questo capitolo si riporta una breve descrizione dello sferoide tumorale, delle sue caratteristiche meccaniche e della risposta mecano-biologica che si osserva quando esso è sottoposto a carico. La descrizione si basa sulla letteratura esistente che si è ritenuta di particolare interesse per lo svolgimento del presente lavoro.

1.1. Lo sferoide tumorale

Per lo studio dei tumori in vitro, spesso l'oggetto esaminato non è la cellula tumorale singola, ma bensì lo sferoide tumorale, ossia un agglomerato di cellule tumorali che interagiscono meccanicamente le une con le altre.

Gli sferoidi tumorali permettono la riproduzione in vitro di alcune condizioni del tumore in vivo, in quanto è stato osservato sperimentalmente come i modelli cellulari 3D mimino più fedelmente i gradienti fisiologici (ad esempio i gradienti di concentrazione di ossigeno e dei fattori di crescita) rispetto ai modelli 2D basati su un unico strato di cellule [1]. Riprodurre correttamente questi gradienti è importante in quanto essi costituiscono un fattore di rilievo per la definizione di opportune strategie terapeutiche. Infatti, è stato verificato sperimentalmente come l'efficacia di alcuni approcci terapeutici diminuisca in un modello tridimensionale rispetto al classico mono-layer cellulare [1], per i quali tutte le cellule sono a contatto con sorgenti esterne uniformi di farmaci.

Lo sferoide cellulare può essere ottenuto in vitro tramite diverse tecniche, le quali prevedono un monitoraggio della forma dell'oggetto e della dimensione raggiunta e si pongono l'obiettivo di promuovere l'accoppiamento cellula-cellula vincendo le interazioni di superficie tra una cellula e l'altra. Alcune strategie impiegabili sono: l'agitazione continua della sospensione cellulare (cellule in soluzione) [2, 3] e l'aggregazione tramite deposizione delle cellule su superfici concave e resistenti all'adesione cellulare, come ad esempio superfici di agarosio [4] o di poli-idrossi-etil-metacrilato (poly-HEMA) [5].

Tutti gli esperimenti riportati nei paragrafi successivi, sono stati condotti in vitro su

sferoidi tumorali multicellulari, con l'obiettivo di riprodurre i meccanismi fisiologici, in particolare dal punto di vista delle interazioni meccaniche tra le cellule e tra sferoide e ambiente circostante.

1.2. Primi esperimenti

I primi esperimenti sullo sferoide tumorale, risalenti agli anni '70, ebbero come obiettivo lo studio della crescita del volume dello sferoide nel tempo, sulla base della disponibilità di nutriente; in un secondo tempo è stata studiata l'inibizione della crescita attraverso l'imposizione di stress meccanici.

Si ritiene interessante riportare un modello di Greenspan del 1975 [6], a partire da studi condotti da Folkman [7], nel quale uno sferoide multicellulare avascolare è stato posto in soluzione all'interno di un recipiente flottante all'interno di un medium di coltura. Per pura diffusione, il nutriente è in grado di penetrare all'interno dello sferoide, permettendo così la duplicazione delle cellule tumorali. In particolare, al crescere del diametro dello sferoide nel tempo, emerge una zona necrotica nel centro dello sferoide (*necrotic kernel*) ed una zona proliferativa (*proliferative rim*) al bordo esterno, a partire dalla quale si osserva un'angiogenesi dei vasi sanguigni intratumorali. Questa disomogeneità nella crescita è stata osservata anche in esperimenti successivi, come ad esempio quelli condotti da Montel et al. [8], riportati nel paragrafo 1.4.

Il primo esperimento che studia la relazione tra sforzo meccanico e crescita è dovuto ad uno studio di Helmlinger et al. del 1997 [9]. In questo lavoro lo sferoide è stato inserito all'interno di una matrice di gel di agarosio (materiale biocompatibile), che, circondando lo sferoide, esercita al bordo una pura pressione. Il confronto tra gli sferoidi inseriti nella matrice di rigidità variabile (controllata tramite la frazione volumetrica solida) e quelli non sottoposti a sforzo evidenzia, nei primi, una variazione dell'apoptosi e nessuna variazione nel tasso di proliferazione cellulare.

Inoltre sono stati riportati gli andamenti della crescita del diametro degli sferoidi sottoposti a diversi carichi, a confronto con gli sferoidi liberi. Come evidenziato in Figura 1, lo sforzo esterno influenza effettivamente la crescita del tumore, che risulta ridotta all'aumentare del carico imposto.

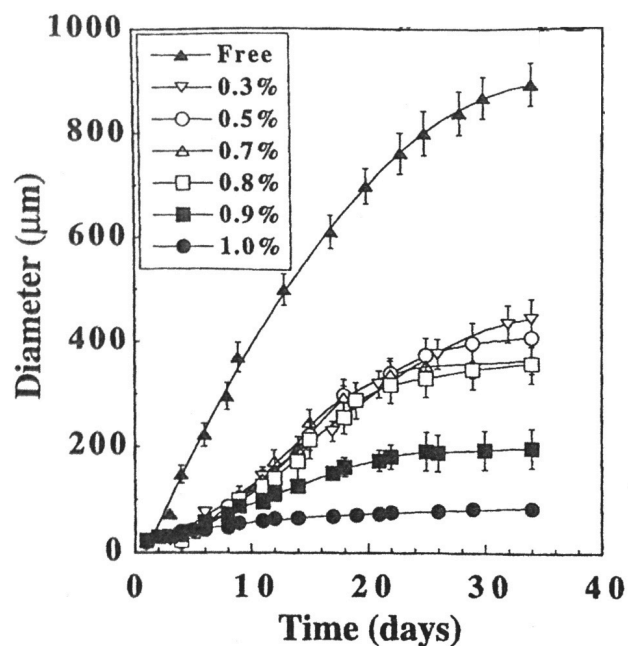


Figura 1. Andamento del diametro degli sferoidi per diverse condizioni di carico [9].

Come riportato dagli autori stessi, i passi successivi dello studio avrebbero dovuto essere: ricavare la relazione tra sforzi interni e carichi al bordo nello sferoide, identificare quali elementi della matrice extracellulare giochino un ruolo principale nella generazione dello sforzo ed inoltre come lo sforzo può essere modulato modificando la composizione della matrice. Questi aspetti sono stati indagati da Stylianopoulos et al. [10] in studi successivi, per i quali si rimanda al paragrafo 1.3.

Si citano inoltre due lavori teorici che si sono occupati dell'approfondimento di questi aspetti (Ambrosi e Mollica [11] e Roose et al. [12]).

1.3. Stylianopoulos: gli sforzi residui

Un approccio differente allo studio della meccanica dello sferoide tumorale è stato sviluppato da Stylianopoulos et al. nel 2012 [10]. Questo gruppo ha ipotizzato e verificato sperimentalmente la presenza di sforzi residui all'interno dello sferoide tumorale, accumulati durante la crescita del tumore ed esercitati prevalentemente dalle componenti della matrice solida dello sferoide (matrice extracellulare), tra cui: collagene, ialuronani e

fibroblasti. Secondo Stylianopoulos et al., la presenza di questi stress gioca un ruolo significativo nell'azione del tumore all'interno di un organismo, a causa della deformazione dei tessuti circostanti ed in particolar modo della compressione dei vasi sanguigni e linfatici intratumorali. Contrariamente a quanto si potrebbe pensare, quest'ultimo fattore risulterebbe sfavorevole per l'organismo, in quanto l'occlusione dei vasi porterebbe ad una limitata perfusione di anticorpi e farmaci all'interno del tumore, riducendo in tal modo l'azione di chemio e radioterapie. Pertanto la proposta di Stylianopoulos è quella di alleviare gli stress residui, riducendo in particolare il numero di componenti della matrice extracellulare e portando così ad una maggiore perfusione dei vasi tumorali. D'altro canto, come riportato nel lavoro stesso, il rischio nell'applicazione di questa tecnica è duplice. In primo luogo un'inibizione degli stress residui, potrebbe comportare una maggiore metastatizzazione del tumore, per via della maggiore facilità d'invasione dei tessuti circostanti; ed inoltre la maggiore perfusione dei vasi sanguigni permetterebbe una crescita superiore del tumore, per via del più semplice apporto di nutrienti. Pertanto la nuova tecnica proposta andrebbe combinata a metodi che incrementino e facilitino il flusso di farmaci all'interno dello sferoide.

In conclusione, questo gruppo ha sviluppato una tecnica semplice per stimare l'entità dello sforzo residuo (taglio del tumore per l'80% del suo diametro e misura dell'apertura generata dal rilassamento della tensione, Figura 2), proponendo inoltre un metodo alternativo alla riduzione dell'azione del tumore sull'organismo.

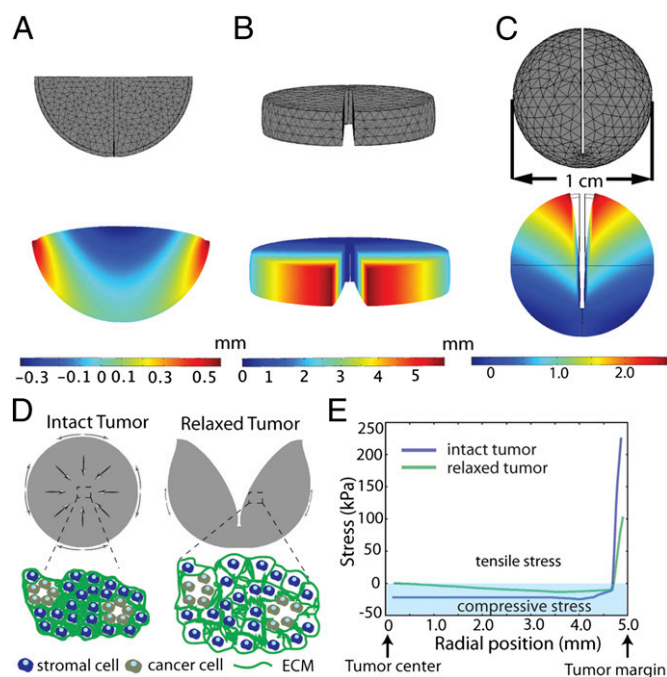


Figura 2. *figure A,B: tecniche non idonee per il calcolo degli sforzi residui; figura C: tecnica ideata da Stylianopoulos et al. (taglio del tumore per l'80% del suo diametro); figure D ed E: calcolo degli sforzi residui. [10]*

1.4. Montel et al.: gli stress osmotici

In questo paragrafo si riportano una serie di esperimenti svolti dal gruppo di Montel [8] con l'obiettivo di verificare l'influenza degli stress meccanici sulla crescita dello sferoide tumorale.

La prima pubblicazione riportata riguarda uno studio del 2011, nell'ambito del quale lo sferoide multicellulare è stato sottoposto a stress osmotici, generati inserendo lo sferoide in soluzione con molecole di *destrano*, un polimero neutro biocompatibile di grosse dimensioni (diametro della macromolecola a riposo pari a 900 micron), che pertanto non è in grado di penetrare né all'interno della membrana multicellulare né all'interno dello spazio interstiziale intercellulare. Il gradiente di pressione osmotica viene generato tra due compartimenti separati da una membrana (in questo caso la membrana cellulare) in presenza di molecole di soluto incapaci di attraversare la membrana, in concentrazione

maggiore in uno dei due compartimenti e minore (o assente) nell'altro compartimento. Per ulteriori approfondimenti su questo fenomeno si rimanda al paragrafo 2.5.2.

Gli stress osmotici in questo esperimento sono stati indotti attraverso due differenti procedure: una indiretta ed una diretta.

Nell'approccio indiretto, lo sferoide viene inserito all'interno di una sacca per dialisi riempita di medium; esternamente alla sacca vi è la medesima soluzione, ma con all'interno molecole di destrano (non presenti all'interno della sacca). La generazione del gradiente di pressione osmotica tra i compartimenti induce un flusso di solvente uscente dalla sacca verso l'esterno, con conseguente riduzione del volume di liquido all'interno della sacca. Grazie ad una sorta di "effetto domino", tramite il pathway della protein-chinasi [13], il gradiente osmotico viene trasmesso al primo strato di cellule dello sferoide tumorale e via via agli strati successivi, con conseguente riduzione del volume dello sferoide stesso (Figura 3).

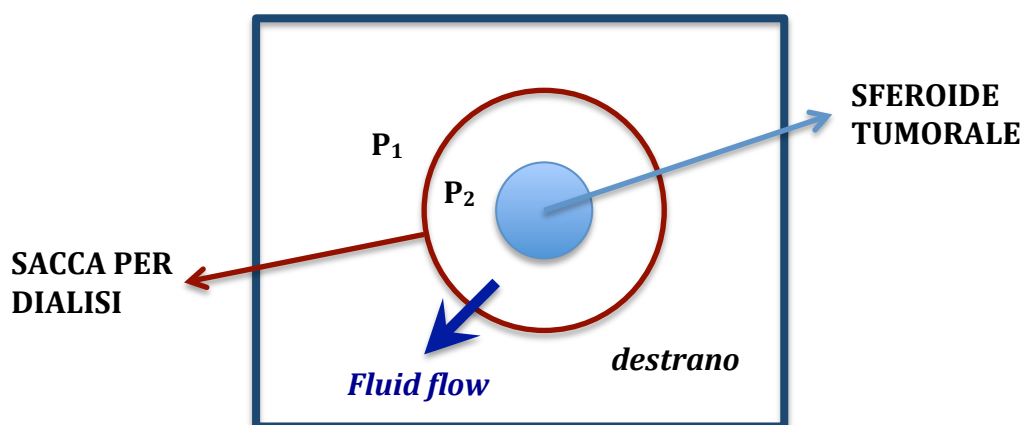


Figura 3. Schematizzazione dell'esperimento inverso eseguito da Montel et al. []. Lo sferoide tumorale è posto all'interno di una sacca per dialisi. Il gradiente di pressione osmotica tra l'interno della sacca e l'esterno ($P_2 > P_1$), dovuto alla presenza del destrano (che non oltrepassa la sacca), genera un flusso di solvente (fluid flow) dalla sacca verso l'esterno.

Questo metodo viene impiegato al fine di assicurarsi che le molecole di destrano non penetrino effettivamente all'interno dello sferoide tumorale.

Successivamente è stato applicato un metodo diretto (Figura 4), inserendo lo sferoide a contatto con la soluzione contenente il destrano. In questo caso il primo strato di cellule dello sferoide gioca il ruolo della sacca per dialisi nell'esperimento indiretto, ma il risultato ottenuto è il medesimo.

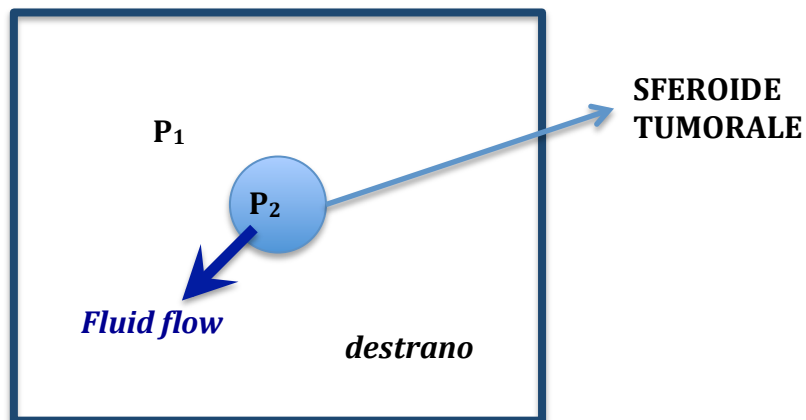


Figura 4. Schematizzazione del metodo diretto impiegato da Montel et al. []. Il gradiente di pressione osmotica tra lo sferoide e l'esterno, dovuto alla presenza del dextrano, incapace di penetrare all'interno dello sferoide, generano un flusso di solvente dallo sferoide verso l'esterno (fluid flow).

Ciò che è stato ricavato attraverso questi esperimenti è innanzitutto un andamento del volume dello sferoide in funzione del tempo a diversi stress osmotici imposti corrispondenti a diverse concentrazioni di dextrano (Figura 5).

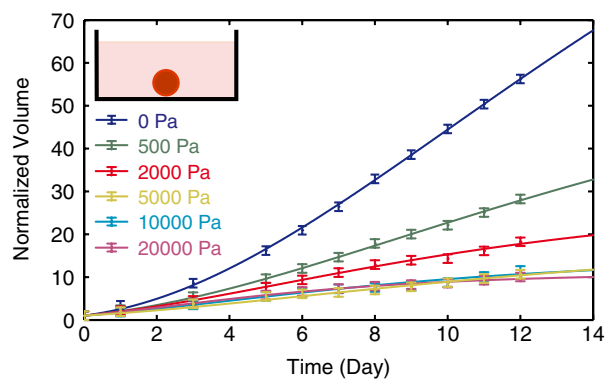


Figura 5. Andamento del volume dello sferoide (normalizzato rispetto al volume iniziale) in funzione del tempo a diversi stress osmotici imposti [8].

Come evidenziato dai grafici, il tasso di crescita del volume normalizzato diminuisce al crescere dello sforzo applicato al bordo, raggiungendo per valori di stress molto elevati (20 KPa) uno stato stazionario nel giro di due settimane.

Un'altra evidenza interessante riguarda l'andamento della crescita all'interno dello sferoide tumorale; il gruppo di ricerca ha osservato sia attraverso esperimenti in vitro che tramite

simulazione numerica, una disomogeneità nella crescita del tumore. Infatti, come evidenziato in Figura 6, nel caso in cui non venga applicato nessun carico sul bordo, si osserva una mitosi distribuita abbastanza omogeneamente su tutto lo sferoide. Diversamente, quando viene imposto un carico al bordo, si nota un accumulo delle cellule apoptotiche nel nucleo dello sferoide ed un'assenza di mitosi in questa area, in contrasto con un'invariata mitosi al bordo esterno.

Si osserva come questo risultato sia coerente con quanto ottenuto in studi precedenti da Helmlinger et al. [9] (Figura 1).

Occorre inoltre precisare che il gruppo di Montel et al. verifica che i nutrienti siano largamente disponibili in tutto il volume dello sferoide, escludendo quindi che le variazioni di mitosi ed apoptosi siano dovute a disomogeneità nella concentrazione di nutrienti.

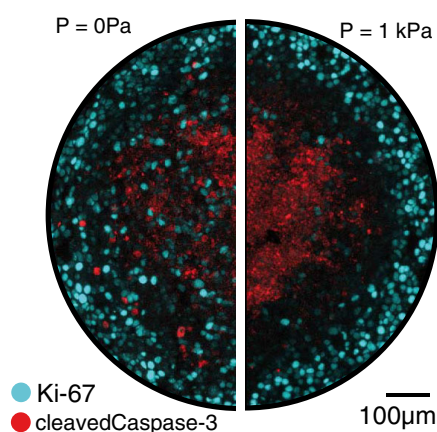


Figura 6. Andamento della crescita lungo il raggio dello sferoide multicellulare [8].

Uno studio successivo, svolto dal gruppo di Montel [14] nel 2013, partendo dalle evidenze sperimentali osservate nello studio precedentemente riportato [8], si è posto l'obiettivo di misurare l'influenza dello sforzo meccanico sul flusso delle cellule tumorali all'interno dello sferoide dalla periferia verso il centro.

L'esperimento è stato svolto colorando con opportuni marker lo strato cellulare periferico ed è stato condotto sia su sferoidi che hanno raggiunto lo stato di equilibrio (dopo essere stati sottoposti a sforzo) che su sferoidi in crescita (con diametro iniziale di 200 µm), analizzando sia il caso di carico esterno nullo che una situazione di carico esterno pari a 5

KPa (imposto, come nei lavori precedenti, attraverso un salto di pressione osmotica indotto dalle molecole di destrano).

I risultati ottenuti (Figura 7) evidenziano un flusso di cellule dalla periferia verso il centro dello sferoide (flusso radiale convergente) (Dorie, 1982 [15]).

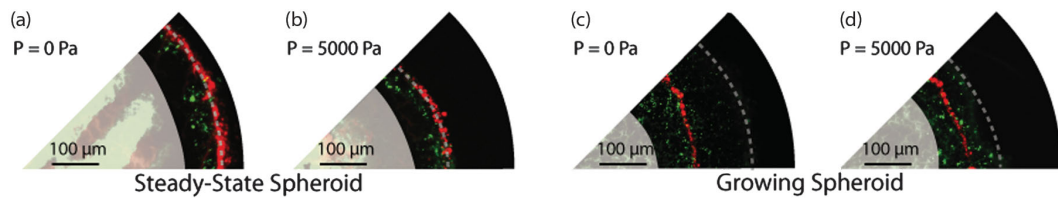


Figura 7. Flusso cellulare (verde) nel caso di sferoide in equilibrio (figure a e b) e di sferoide in crescita (figure c e d). Il rosso raffigura lo stato iniziale. [14]

Come si evince dalla figura, il flusso di cellule (rappresentato in verde) risulta ridotto in entrambi i casi quando viene imposto un carico esterno di 5 KPa.

Inoltre, nel caso di sferoide in crescita, si osserva, in aggiunta al flusso convergente, un flusso divergente che fa muovere le cellule lungo il bordo esterno dello sferoide; questo flusso è anch'esso ridotto nel caso in cui sia imposto il carico esterno.

Sulla base degli ultimi studi qui riportati, in questa tesi si è sviluppato un modello matematico che potesse rappresentare il comportamento meccanico dello sferoide osservato sperimentalmente.

2. Materiali e metodi

In questo capitolo sono riportati gli strumenti metodologici utilizzati per lo svolgimento di questa tesi. Essi possono essere schematizzati come segue.

- Proprietà meccaniche e caratteristiche reologiche dello sferoide tumorale;
- Software per le simulazioni numeriche;
- Modelli matematici;
- Metodi numerici;
- Elementi di poroelasticità e di biofisica cellulare;

2.1. Proprietà meccaniche e caratteristiche reologiche dello sferoide tumorale

Uno degli obiettivi di questo lavoro è stato la realizzazione di un modello che simuli quanto osservato sperimentalmente dal gruppo di Montel et al. [8]; le proprietà del tessuto tumorale sono state studiate sulla base del loro lavoro e sulla base di quanto noto in letteratura.

In particolare, nel modello computazionale sono stati inseriti i seguenti valori dei parametri materiali:

- Modulo elastico: $E = 30$ KPa, valore tipico di alcuni tessuti biologici molli;
- Modulo di Poisson: $\nu = 0.45$, valore caratteristico di un mezzo poco comprimibile, in quanto largamente costituito da acqua;
- Raggio sferoide iniziale: $R = 450$ μm , valore misurato sperimentalmente da Montel et al. [8];
- Carico esterno applicato: $P_{\text{Dextran}} = 0, 1, 2, 10, 20$ KPa, carichi esterni imposti sperimentalmente da Montel et al. [8] modulando la densità del destrano nel soluto.

2.2. Software per le simulazioni

Per le simulazioni numeriche alle differenze finite è stato utilizzato il software Matlab versione R2013a.

2.3. Modelli matematici

Al fine di ricavare un modello matematico che rappresenti adeguatamente quanto osservato sperimentalmente da Montel et al., sono stati analizzati inizialmente alcuni modelli proposti in letteratura.

In questo capitolo si valuta criticamente la loro efficacia nel poter spiegare gli esperimenti che si ha interesse a riprodurre.

2.3.1. Modello fluido

Il moto di un fluido viscoso incomprimibile viene descritto dalle equazioni di Navier-Stokes [16, 17], riportate di seguito, e costituite da un'equazione scalare di conservazione della massa e da un'equazione vettoriale di bilancio della quantità di moto.

$$\operatorname{div}(\bar{v}) = 0$$

$$\rho \left[\frac{d\bar{v}}{dt} + (\bar{v} \cdot \nabla) \cdot \bar{v} \right] = -\nabla P + \mu \Delta \bar{v} + \rho \bar{F}$$

dove ρ rappresenta la massa per unità di volume del fluido (densità), μ la viscosità dinamica, \bar{v} il vettore velocità del fluido, P è la pressione, ed \bar{F} il vettore delle forze volumiche che agiscono sul volumetto fluido (ad esempio la forza di gravità).

I diversi termini dell'equazione forniscono contributi di natura differente. In particolare:

- $\rho \frac{d\bar{v}}{dt} \rightarrow$ variazione nel tempo della quantità di moto in un punto (nullo nel caso di problema stazionario);
- $\rho[(\bar{v} \cdot \nabla) \cdot \bar{v}] \rightarrow$ termine inerziale che rappresenta il trasporto convettivo del fluido;

- $\nabla\bar{P} \rightarrow$ gradiente pressorio dovuto alla forze di superficie agenti sul fluido;
- $\mu\Delta\bar{v} \rightarrow$ termine diffusivo che rappresenta le forze interne dovute a sforzi viscosi;
- $\rho\bar{F} \rightarrow$ termine che rappresenta l'azione delle forze di volume sul fluido.

Osservando le equazioni di Navier-Stokes, si nota come nel sistema in esame alcune componenti risultino trascurabili.

- $\bar{v} = 0$, in quanto le componenti di velocità sono tutte nulle all'interno dello sferoide (caso idrostatico);
- $\rho\bar{F} = 0$, le forze di volume agenti sul fluido sono trascurabili;

L'unico campo non nullo è la pressione idrostatica; le equazioni di Navier-Stokes si riducono pertanto a:

$$\nabla P = 0$$

Secondo il modello reologico fluido, la pressione sarebbe perciò costante all'interno di tutto lo sferoide, con sforzo uguale in tutte le direzioni.

Questa tipologia di modello, puramente fluido, non appare dunque adeguata per la descrizione né degli sforzi residui osservati da Stylianopoulos [10] né del comportamento meccanico dello sferoide tumorale, osservato sperimentalmente, in cui la disomogeneità della crescita tumorale volumetrica è innescata da un carico al bordo.

2.3.2. Modello solido elastico lineare

Le equazioni di equilibrio per un solido elastico lineare, in coordinate sferiche e nel caso stazionario, vengono ricavate a partire dalle equazioni indefinite di equilibrio e dalle equazioni di legame costitutivo [18], che legano gli sforzi alla velocità ed allo spostamento del solido.

Il legame costitutivo in coordinate sferiche è espresso dalle equazioni seguenti [19]:

$$T_{rr} = \lambda \cdot tr\varepsilon + 2\mu \frac{\partial u_r}{\partial r}$$

$$T_{\theta\theta} = \lambda \cdot tr\varepsilon + 2\mu \frac{1}{r} \left(\frac{\partial u_\theta}{\partial \theta} + u_r \right);$$

$$T_{\phi\phi} = \lambda \cdot tr\varepsilon + 2\mu \frac{1}{r} \left(\frac{1}{\sin\theta} \frac{\partial u_\phi}{\partial \phi} + u_\theta \cot\theta + u_r \right);$$

dove $T_{rr}, T_{\theta\theta}$ e $T_{\phi\phi}$ rappresentano le componenti sulla diagonale principale del tensore degli sforzi; u_r, u_θ ed u_ϕ sono le componenti del vettore spostamento; λ e μ sono costanti che dipendono dal modulo di Young E e dal modulo di Poisson ν :

$$\lambda = \frac{\nu E}{(1 + \nu)(1 - 2\nu)};$$

$$\mu = \frac{E}{2(1 + \nu)};$$

Il termine $tr\varepsilon$ rappresenta la traccia del tensore delle deformazioni ε , che in coordinate sferiche viene espresso come:

$$tr\varepsilon = \frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial u_\theta}{\partial \theta} + 2 \frac{u_r}{r} + \frac{1}{r \sin\theta} \frac{\partial u_\phi}{\partial \phi} + \frac{u_\theta}{r} \cot\theta;$$

Considerando per semplicità uno spostamento nella sola direzione radiale ($u_r \neq 0$; $u_\theta = u_\phi = 0$), le equazioni di legame costitutivo possono essere semplificate come segue:

$$T_{rr} = (\lambda + 2\mu) \frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{2\lambda}{r} u_r;$$

$$T_{\theta\theta} = T_{\phi\phi} = \lambda \frac{\partial u_r}{\partial r} + 2(\lambda + \mu) \frac{u_r}{r};$$

Le componenti del tensore che non si trovano sulla diagonale principale ($T_{r\theta}, T_{r\theta}, T_{\theta\phi}$ ed i loro simmetrici) vengono trascurate dal momento che l'unica componente dello spostamento diversa da zero è u_r e che tale componente risulti dipendente dalla sola coordinata radiale.

Le equazioni indefinite di equilibrio in forma vettoriale, in coordinate sferiche sono [19]:

$$\bar{F} + (\lambda + \mu)\text{grad}(\text{div}\bar{u}) + \mu\Delta\bar{u} = 0$$

dove il vettore F rappresenta le forze volumetriche agenti sul solido e \bar{u} è il vettore spostamento.

Si ricorda che:

- Il Laplaciano in coordinate sferiche ha la forma:

$$\Delta u_r = \frac{1}{r^2} \frac{\partial(r^2 \frac{\partial u_r}{\partial r})}{\partial r} + \frac{1}{r^2 \sin\theta} \frac{\partial u_r}{\partial \theta} + \frac{1}{r^2 \sin^2\theta} \frac{\partial^2 u_r}{\partial \phi^2}$$

$$\Delta u_\theta = \frac{1}{r^2} \frac{\partial(r^2 \frac{\partial u_\theta}{\partial r})}{\partial r} + \frac{1}{r^2 \sin\theta} \frac{\partial u_\theta}{\partial \theta} + \frac{1}{r^2 \sin^2\theta} \frac{\partial^2 u_\theta}{\partial \phi^2}$$

$$\Delta u_\phi = \frac{1}{r^2} \frac{\partial(r^2 \frac{\partial u_\phi}{\partial r})}{\partial r} + \frac{1}{r^2 \sin\theta} \frac{\partial u_\phi}{\partial \theta} + \frac{1}{r^2 \sin^2\theta} \frac{\partial^2 u_\phi}{\partial \phi^2}$$

- La divergenza in coordinate sferiche viene espressa come:

$$\text{div}\bar{u} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial(r^2 u_r)}{\partial r} + \frac{1}{r \sin\theta} \frac{\partial(u_\theta \sin\theta)}{\partial \theta} + \frac{1}{r \sin\theta} \frac{\partial(u_\phi)}{\partial \phi}$$

Sviluppando le equazioni nelle tre direzioni, si ottiene:

$$\begin{aligned}
(r) \quad F_r + (\lambda + \mu) \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial u_\theta}{\partial \theta} + \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial u_\phi}{\partial \phi} + \frac{2}{r} u_r + \frac{u_\theta}{r} \cot \theta \right) \\
+ \mu \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial u_r}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial u_r}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial^2 u_r}{\partial \phi^2} \right. \\
\left. - \frac{2}{r^2} \left(u_r + \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} (u_\theta \sin \theta) + \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial u_\phi}{\partial \phi} \right) \right] = 0;
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
(\theta) \quad F_\theta + (\lambda + \mu) \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial u_\theta}{\partial \theta} + \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial u_\phi}{\partial \phi} + \frac{2}{r} u_r + \frac{u_\theta}{r} \cot \theta \right) \\
+ \mu \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial u_\theta}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial u_\theta}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2 u_\theta}{\partial \phi^2} \right. \\
\left. + \frac{2}{r^2} \left(\frac{\partial u_r}{\partial \phi} - \frac{u_\phi}{2 \sin^2 \theta} + \frac{\cos \theta}{\sin^2 \theta} \frac{\partial u_\phi}{\partial \phi} \right) \right] = 0;
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
(\phi) \quad F_\phi + (\lambda + \mu) \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \phi} \left(\frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial u_\theta}{\partial \theta} + \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial u_\phi}{\partial \phi} + \frac{2}{r} u_r + \frac{u_\theta}{r} \cot \theta \right) \\
+ \mu \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial u_\phi}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial u_\phi}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2 u_\phi}{\partial \phi^2} \right. \\
\left. + \frac{2}{r^2 \sin \theta} \left(\frac{\partial u_r}{\partial \phi} + \cot \theta \frac{\partial u_\theta}{\partial \phi} - \frac{u_\phi}{2 \sin \theta} \right) \right] = 0;
\end{aligned}$$

Nell'ipotesi di simmetria sferica, considerando un vettore spostamento con la sola componente radiale diversa da zero ($\bar{u} = \begin{bmatrix} u_r \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$) e trascurando le forze volumetriche (dal momento che il destrano non è in grado di penetrare all'interno dello sferoide [8] e pertanto il carico agisce soltanto sulla superficie esterna), le equazioni indefinite di equilibrio possono essere riscritte come segue.

$$\begin{aligned}
(r) \quad & (\lambda + \mu) \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{2}{r} u_r \right) \\
& + \mu \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial u_r}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial u_r}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial^2 u_r}{\partial \phi^2} - \frac{2}{r^2} (u_r) \right] \\
& = 0;
\end{aligned}$$

$$(\theta) \quad (\lambda + \mu) \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{2}{r} u_r \right) + \mu \left[\frac{2}{r^2} \left(\frac{\partial u_r}{\partial \phi} \right) \right] = 0;$$

$$(\phi) \quad (\lambda + \mu) \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \phi} \left(\frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{2}{r} u_r \right) + \mu \left[\frac{2}{r^2 \sin \theta} \left(\frac{\partial u_r}{\partial \phi} \right) \right] = 0;$$

da cui si ricava:

$$\frac{\partial u_r(r)}{\partial \theta} = 0;$$

$$\frac{\partial u_r(r)}{\partial \phi} = 0;$$

Pertanto l'equazione in direzione radiale assumerà la forma:

$$(r) \quad (\lambda + \mu) \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{2}{r} u_r \right) + \mu \left[\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial u_r}{\partial r} \right) - \frac{2}{r^2} (u_r) \right] = 0;$$

da cui, svolgendo le derivate ed effettuando le dovute semplificazioni, si ottiene l'equazione finale in direzione radiale:

$$(r) \quad \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{du_r(r)}{dr} \right) - 2 \frac{u_r(r)}{r^2} = 0$$

Trattandosi di un'equazione differenziale del secondo ordine, essa necessita di una condizione per ogni punto di bordo per essere risolta.

Nel nostro caso, u_r rappresenta lo spostamento della componente solida dello sferoide in direzione radiale ed r rappresenta la coordinata radiale. Il dominio, trattandosi di un

problema in coordinate sferiche con simmetria sferica, sarà una circonferenza di raggio R , con $0 < r < R$.

Le condizioni al bordo scelte per l'applicazione di questo modello vengono riportate di seguito.

$$f(x) = \begin{cases} u_r = 0, & r = 0 \\ T_{rr} = (\lambda + 2\mu) \frac{du_r}{dr} + \frac{2\lambda}{r} u_r = -P_{dextran}, & r = R \end{cases}$$

in cui T_{rr} rappresenta lo sforzo in direzione radiale; $P_{dextran}$ è la componente normale del carico esterno applicato sullo sferoide. Si precisa, ancora una volta, che il carico esterno dovuto al destrano, il quale si è ipotizzato agire soltanto sulla componente solida della miscela, agisce soltanto sul bordo esterno dello sferoide, dal momento che il soluto non penetra all'interno. Per tale ragione la $P_{dextran}$ è stata imposta soltanto sulla condizione al bordo.

L'equazione può essere risolta analiticamente; trattandosi di un'equazione differenziale lineare omogenea del secondo ordine con coefficienti variabili, essa è stata risolta col metodo di sostituzione.

$$u_r'' + \frac{2}{r} u_r' - \frac{2}{r^2} u_r = 0;$$

considerando $u_r(r) = C_1 r^k$, si ha che:

$$\begin{cases} u_r' = C_1 k r^{k-1} \\ u_r'' = C_1 k(k-1) r^{k-2} \end{cases}$$

Sostituendo i termini nell'equazione di partenza si ottiene:

$$C_1 k(k-1) r^{k-2} + \frac{4C_1}{r} k r^{k-1} - \frac{4C_1}{r^2} r^k = 0$$

Semplificando il termine costante C_1 ed il termine r^{k-2} e svolgendo i prodotti, si ricava:

$$k^2 + 3k - 4 = 0$$

Questa equazione del secondo ordine, presenta due soluzioni:

$$k_1 = -2; k_2 = 1;$$

Per individuare la soluzione corretta, si torna alla variabile originaria u_r e si applicano le condizioni al bordo, cercando una soluzione non banale dell'equazione.

$$u_r(r) = C_1 r^k$$

1. $k = -2 \Rightarrow u_r(r) = \frac{C_1}{r^2}$

2. $k = 1 \Rightarrow u_r(r) = C_1 r$

Applicando la prima condizione al bordo al caso 1, si ottiene soltanto una soluzione banale:

$$u_r(r) = 0, \forall r \in [0, R]$$

Applicando invece la seconda condizione al bordo al caso 2, si ottiene:

$$C_1 = -\frac{P_{dextran}}{(3\lambda + 2\mu)};$$

Pertanto la soluzione finale $u_r(r)$ sarà:

$$u_r(r) = -\frac{P_{dextran}}{(3\lambda + 2\mu)} r, \quad 0 < r < R$$

che soddisfa anche la prima condizione al bordo ($u_r(r) = 0$).

Una volta calcolato lo spostamento, attraverso le equazioni indefinite di equilibrio, è stato possibile risalire alle espressioni degli sforzi.

$$T_{rr}(r) = (\lambda + 2\mu) \frac{du_r(r)}{dr} + \frac{2\lambda}{r} u_r = -P_{dextran}; \quad 0 < r < R$$

$$T_{\theta\theta}(r) = T_{\phi\phi}(r) = \lambda \frac{du_r(r)}{dr} + 2(\lambda + \mu) \frac{u_r(r)}{r} = -P_{dextran}; \quad 0 < r < R$$

Gli sforzi nelle tre direzioni risultano pertanto costanti, escludendo in tal modo, con l'applicazione di questo modello, la possibilità di ottenere un gradiente di sforzo all'interno dello sferoide.

Pertanto, anche questo modello, puramente elastico, si mostra inadeguato per la descrizione della meccanica dello sferoide tumorale.

2.3.3. Modello poroelastico

Un materiale viene definito poroelastico se non è costituito da un solido omogeneo, ma bensì da una parte solida con all'interno dei pori, i quali possono essere riempiti da un fluido, aria o da una loro miscela [20].

L'approccio più comunemente impiegato per descrivere il moto nei mezzi poroelastici consiste nella cosiddetta omogeneizzazione: attraverso opportune medie spaziali, il solido poroso viene cioè rappresentato come un continuo in cui, in ogni punto, coesistono le componenti in diversa misura in senso mediato [20], e pertanto le proprietà di un volume infinitesimo o dell'intero costruito risultano analoghe, permettendo così di estendere i concetti di tensione e deformazione, tipici dei mezzi continui, anche ad un costruito multifase [20].

Il volume viene anche definito *Reference Element Volume* e rappresenta il volume della porzione dell'intero costruito nel quale si è scelto di operare le medie, le cui dimensioni risultano molto più piccole di quelle dell'intero solido poroso, ma molto più grandi delle dimensioni di un poro.

Ogni caratteristica degli elementi nel REV va considerata mediata rispetto ad esso, dipende dal punto ed i campi della miscela sono definiti in ogni punto del mezzo poroelastico.

In un approccio bifasico è opportuno introdurre il concetto di frazione volumetrica $\phi(\underline{x})$, definita come la porzione di volume occupata da una componente in un punto di una miscela rispetto al volume totale. Nel caso di un mezzo poroso, si avrà che:

$$\varphi_s(\underline{x}) = \frac{V_s}{V};$$

$$\varphi_f(\underline{x}) = \frac{V_f}{V};$$

dove V_s, V_f e V rappresentano rispettivamente il volume occupato dal solido, il volume occupato dal fluido ed il volume totale, in un elemento di volume di riferimento centrato in \underline{x} , legati fra loro dalla relazione:

$$V = V_s + V_f$$

Pertanto si avrà necessariamente:

$$\varphi_s(\underline{x}) + \varphi_f(\underline{x}) = 1,$$

dove $\varphi_s(\underline{x})$ e $\varphi_f(\underline{x})$ costituiscono rispettivamente la frazione di volume occupata dal solido e quella occupata dal fluido in un punto della miscela.

Si introduce qui l'ipotesi che il carico esterno si applichi soltanto alla componente solida, in quanto il bilancio di forze tra lo sferoide e la soluzione esterna risulta:

$$P_{f,int} + \varphi_s(\underline{x})T_s(\underline{x}) = P_{f,ext} - P_{dextran}$$

dove $P_{f,int}$ è la pressione interstiziale (data dal fluido) all'interno dello sferoide; $P_{f,ext}$ è la pressione esercitata dal solvente all'esterno; $P_{dextran}$ è il carico esterno esercitato dal soluto e T_s è lo sforzo relativo alla parte solida dello sferoide (cellule).

Supponendo che le pressioni esercitate dalla componente fluida della miscela si bilancino tra di loro ($P_{f,int} = P_{f,ext}$), si ipotizza che la pressione esercitata dal destrano eguagli lo sforzo della componente solida dello sferoide:

$$\varphi_s(\underline{x})T_s(\underline{x}) = -P_{dextran}$$

Considerando una frazione volumetrica solida in generale dipendente dalla coordinata radiale, l'equazione di equilibrio in direzione radiale assumerà la forma:

$$(r) \quad \frac{\partial}{\partial r} (\varphi_s T_{rr}) + \frac{2}{r} \varphi_s (T_{rr} - T_{\theta\theta}) = 0;$$

$$+ c. b: \begin{cases} u_r(r = 0) = 0; \\ \varphi_s T_{rr}(r = R) = -P_{dextran} \end{cases}$$

Il modello poroelastico dovrebbe quindi permettere, in linea di principio, di rendere conto di stress non omogeneo quando la frazione volumetrica $\varphi_s(r)$ non è costante.

Lo sviluppo di questo modello, che è risultato il più adatto al caso in esame, viene riportato dettagliatamente nel capitolo 3.

2.4. Metodi numerici

Per la discretizzazione alle differenze finite, sono stati utilizzati alcuni schemi numerici noti. In particolare sono stati impiegati:

- Schemi centrati per l'approssimazione delle derivate spaziali;
- Metodi di Eulero in avanti ed Eulero all'indietro per la discretizzazione in tempo;
- Schema decentrato per le condizioni al bordo esterno.

2.4.1. Schema centrato

Per le approssimazioni delle derivate prima e seconda in spazio è stato utilizzato uno schema centrato [21]. Una volta suddiviso l'intervallo spaziale in N_h nodi di distanza h fra loro e posta U_n la variabile discreta che approssima la variabile continua y nel nodo n dello spazio discreto ($n=1, \dots, N_h$), la derivata di y rispetto alla coordinata radiale, può essere discretizzata come segue.

$$\frac{dy}{dr} \cong \frac{U_{n+1} - U_{n-1}}{2h}$$

dove n può assumere in generale valori da 1 ad N_h ed h rappresenta il passo di campionamento.

$$h = \frac{R_{ext} - R_0}{h}$$

Analogamente la derivata seconda viene discretizzata come:

$$\frac{d^2y}{dr^2} \cong \frac{U_{n+1} - 2U_n + U_{n-1}}{h^2}$$

2.4.2. Metodi Eulero in avanti/Eulero all'indietro

Per la discretizzazione in tempo sono stati impiegati i metodi di Eulero avanti ed Eulero indietro. Essi rappresentano rispettivamente uno schema esplicito ed uno implicito.

Per la descrizione dei due metodi, si considera per semplicità il problema di Cauchy ai dati iniziali [21]:

$$\begin{cases} \frac{dy}{dt} = f(y, t) = \psi \cdot y(t) \\ y(0) = y_0 \end{cases}$$

In entrambi i metodi, la derivata prima di una funzione continua viene approssimata con uno schema di tipo decentrato.

$$\frac{dy}{dt} = \frac{U_{j+1} - U_j}{\Delta t}$$

dove U_j rappresenta il valore di y nel nodo j all'interno dell'intervallo di discretizzazione e Δt il passo di campionamento.

La differenza tra i due metodi si palesa nell'approssimazione della funzione a destra nel problema modello. In particolare, il metodo di Eulero in avanti discretizza tale termine come una funzione valutata al tempo t e dalla variabile discreta U calcolata all'iterazione precedente.

Pertanto la variabile discreta all'istante successivo sarà espressa come:

$$U_{j+1} = U_j + \psi \Delta t \cdot f(U_j, t)$$

Diversamente, il metodo di Eulero all'indietro valuta la funzione f all'istante successivo, rendendo così implicito il problema.

$$U_{j+1} = U_j + \Delta t \cdot f(U_{j+1}, t + \Delta t)$$

Il metodo di Eulero all'indietro risulta più complesso computazionalmente; tuttavia presenta il grosso vantaggio di risultare incondizionatamente assolutamente stabile.

Questo aspetto è facilmente dimostrabile considerando il problema modello enunciato precedentemente. Discretizzando la derivata prima con uno schema implicito, si otterrà:

$$U_{j+1} = U_j + \psi \Delta t \cdot U_{j+1}$$

$$U_{j+1} = \frac{1}{1 - \psi \Delta t} U_j$$

La condizione di assoluta stabilità [21] è verificata nel caso in cui:

$$\left| \frac{1}{1 - \psi \Delta t} \right| < 1$$

Come si nota, tale disequazione è soddisfatta per qualunque valore di Δt ed il metodo risulta pertanto incondizionatamente assolutamente stabile.

D'altro canto, il metodo di Eulero avanti non presenta un'elevata complessità di calcolo, ma risulta condizionatamente assolutamente stabile. Effettuando calcoli analoghi a quelli svolti per il metodo di Eulero indietro, ma approssimando con uno schema esplicito la funzione $f(y, t)$, si ottiene:

$$U_{j+1} = U_j + \psi \Delta t \cdot U_j$$

$$U_{j+1} = (1 + \psi\Delta t) \cdot U_j$$

Stavolta la disequazione da soddisfare risulta:

$$|1 + \psi\Delta t| < 1$$

Come deducibile, tale condizione non è verificata per ogni valore di Δt . Effettuando opportuni calcoli analitici, si osserva come la condizione da soddisfare sia [21]:

$$\Delta t < -\frac{2}{\psi}$$

Pertanto il metodo non può essere definito assolutamente stabile, ma risulta esserlo soltanto nel caso in cui sia verificata questa specifica condizione.

2.4.3. Schema decentrato

Per la discretizzazione delle condizioni al bordo, è stato impiegato uno schema decentrato, il quale rappresenta la derivata prima di una generica funzione continua come [21]:

$$\frac{dy}{dr} = \frac{U_n - U_{n-1}}{h}$$

dove h rappresenta il passo di discretizzazione ed n il nodo di campionamento dell'intervallo considerato.

Dal punto di vista della stabilità, trattandosi di uno schema esplicito, il metodo risulta condizionatamente assolutamente stabile.

2.5. Elementi di poroelasticità e di biofisica cellulare

Nel presente capitolo si riportano i principi fisici che governano il comportamento meccanico dello sferoide tumorale sottoposto a un carico esterno, supponendo che sia ben rappresentabile come un solido elastico lineare permeato da un fluido.

2.5.1. Principio di Von Terzaghi

Il principio di Von Terzaghi (o delle “Tensioni efficaci”), enunciato da Karl Terzaghi nel 1923 [22], viene comunemente impiegato nell’ingegneria civile per studiare il comportamento meccanico dei terreni. Viene più in generale utilizzato in tutti i mezzi poroelastici, inclusi quelli biologici.

L’enunciato di Terzaghi afferma che le tensioni totali agenti in ogni punto del volume considerato possano essere scomposte in due parti:

- La *pressione interstiziale* (definita “*neutra*”) esercitata dal fluido all’interno dei pori, costante in tutte le direzioni (isotropa). Questa condizione è valida a patto che i pori siano tutti interamente riempiti dal fluido (condizione di saturazione).
- La *tensione principale efficace*, ossia la tensione agente esclusivamente sulla parte solida.

L’espressione matematica che ne deriva è la seguente:

$$T_{totale} = T_{efficace} + P_{neutra}$$

L’assunzione fatta da Terzaghi, basata unicamente su dati empirici, afferma inoltre che ogni variazione delle condizioni del solido poroso dovuta ad un carico esterno, si traduca esclusivamente in una variazione delle tensioni efficaci, cioè sullo stato di sforzo della componente solida [22].

Il principio di Von Terzaghi permette inoltre di calcolare il valore delle tensioni efficaci, che non è misurabile sperimentalmente, come differenza tra la tensione totale e la pressione del fluido, se quest’ultima è nota.

$$T_{efficace} = T_{totale} - P_{neutra}$$

Alcune implicazioni di questo principio, interessanti per lo svolgimento del presente lavoro, sono le seguenti [22]:

- Condizione necessaria e sufficiente affinché risulti una variazione della tensione principale efficace è che la parte solida della miscela subisca una deformazione.
- Una variazione di volume comporta una variazione di tensione efficace, ma una variazione di tensione efficace non comporta necessariamente una variazione di volume.

2.5.2. Pressione osmotica

Il metodo impiegato da Montel et al. [8] per applicare un carico sulla superficie dello sferoide tumorale che si trasmetta solo alla parte solida (inserimento dello sferoide in una soluzione contenente molecole di destrano), si basa sul concetto di *gradiente di pressione osmotica*.

La pressione osmotica π viene definita come la forza per unità di superficie generata da una differenza di concentrazione ai lati di una membrana; se i pori della membrana sono impermeabili alle molecole di un soluto, essi generano un flusso di solvente dalla soluzione meno diluita (concentrazione di soluto maggiore) a quella più diluita (concentrazione di soluto minore).

In generale, il flusso di solvente $\bar{J}_{solvente}$ viene espresso attraverso la Legge di Starling [23]:

$$\bar{J}_{solvente} = Lp \cdot (\Delta P - \Delta\pi)$$

dove Lp è il coefficiente di filtrazione della membrana, ΔP il gradiente di pressione idrostatica e $\Delta\pi$ il gradiente di pressione osmotica, che dipende dalla concentrazione di soluto secondo la legge di Van't Hoff [23]:

$$\Delta\pi = k\Delta C$$

dove k è una costante e ΔC è la differenza di concentrazione di soluto a cavallo della membrana.

Come si nota, secondo la legge di Starling il flusso di solvente avviene soltanto quando la differenza tra il salto di pressione interstiziale e il salto di pressione osmotica è diversa da zero.

Per spiegare il fenomeno della formazione di un gradiente di pressione osmotica, si considerino due compartimenti (Figura 8), posti ad una stessa pressione ($\Delta P = 0$), contenenti entrambi una soluzione con concentrazioni differenti di uno stesso soluto (ad esempio: $C_1 = 0$; $C_2 \neq 0$); i due ambienti sono inoltre separati da una membrana semipermeabile (permeabile al solvente, ma non al soluto). [23] A causa del gradiente di concentrazione, ma non potendo il soluto passare da un compartimento all'altro, si genera un flusso di solvente dal compartimento con concentrazione minore (soluzione più diluita) a quello con concentrazione maggiore di soluto (soluzione meno diluita). Il flusso attraverso la membrana genera un salto di pressione al suo interno ΔP , che rappresenta il gradiente di pressione osmotica.

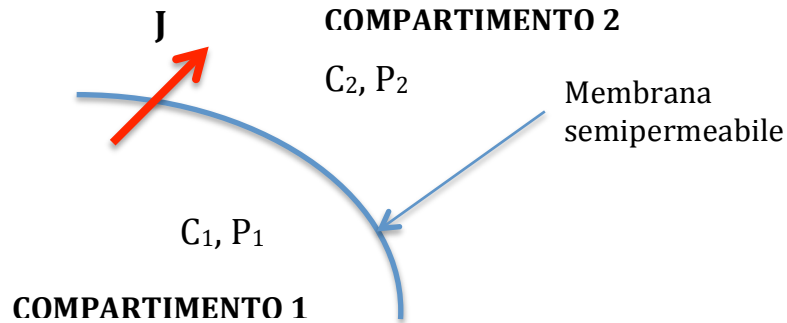


Figura 8. Schematizzazione del flusso di solvente attraverso due compartimenti a concentrazioni diverse di soluto, separati da una membrana semipermeabile. Se $C_2 > C_1$, $J \neq 0$, fino a quando $P_2 - \pi_2(C_2) = P_1 - \pi_1(C_1)$ (equilibrio).

2.5.3. Leggi di crescita

Dal momento che il problema in esame è relativo ad un oggetto in crescita, è necessario formulare delle equazioni costitutive che ne tengano conto.

Trattando di uno sferoide tumorale, occorre riportare due importanti fenomeni: la crescita incompatibile ed il rimodellamento [24]. La prima è dovuta al fatto che, durante la crescita, della massa viene aggiunta e pertanto lo spazio interstiziale tende ad essere insufficiente; questa incompatibilità viene risolta naturalmente dal processo di rimodellamento, un cambiamento a livello di microstruttura indipendente dalla crescita [24].

Basandosi sul concetto che la crescita ed il rimodellamento si bilancino in modo tale da ridurre la differenza tra lo sforzo corrente e lo sforzo target, è possibile formulare una legge di tipo differenziale [24] della frazione volumetrica solida e dello sforzo da essa dipendente.

Per quanto riguarda la continua aggiunta (mitosi) e perdita di massa (apoptosi), l'equazione più adatta a descrivere questo fenomeno è un bilancio di massa [24] sulla parte solida.

3. *Il modello numerico*

Il presente lavoro si è posto l'obiettivo di costruire un modello matematico che descriva opportunamente il comportamento meccanico di uno sferoide tumorale sottoposto a carico esterno.

Come discusso nel capitolo precedente, i modelli fluido e solido elastico lineare non sono adeguati, pertanto si è scelto di sviluppare un modello di tipo poroelastico.

Quello che ci si aspetta di ottenere è un modello che fornisca un gradiente di sforzi, nella componente solida, diverso da zero all'interno dello sferoide tumorale; in particolare il modello ideale presenterà valori di sforzo maggiori, in modulo, nel centro dello sferoide rispetto al bordo esterno.

Come suggerito dalla geometria dello sferoide, il modello è stato scritto in coordinate sferiche e applicato sotto ipotesi di simmetria sferica.

In principio sono stati analizzati due casi:

- φ_s costante e indipendente dalla coordinata radiale r ;
- $\varphi_s(r)$ con andamento crescente con r .

Una volta modellizzato il comportamento meccanico in funzione della coordinata radiale ci si è concentrati sull'evoluzione temporale del modello. A tal fine, si sono ipotizzate due leggi:

- Una legge di crescita per la frazione volumetrica solida $\varphi_s(r,t)$.
- Una legge per l'evoluzione della posizione del raggio nel tempo.

3.1. **Caso φ_s costante**

Ipotizzando una frazione volumetrica della parte solida costante al variare della posizione radiale, l'equazione di equilibrio in direzione radiale può essere riscritta come:

$$(r) \quad \frac{\partial}{\partial r}(\varphi_s T_{rr}) + \frac{2}{r} \varphi_s (T_{rr} - T_{\theta\theta}) = 0; \quad + c. b: \begin{cases} u_r(r=0) = 0; \\ \varphi_s T_{rr}(r=R) = -P_{dextran} \end{cases}$$

Dal momento che la φ_s risulta costante, essa può essere semplificata, ottenendo così un'equazione analoga a quella che governa l'equilibrio in un solido elastico lineare, la cui soluzione, calcolata al paragrafo precedente, risulta:

$$u_r(r) = -\frac{P}{(3\lambda + 2\mu)} r, \quad 0 < r < R$$

Portando a valori costanti di $T_{rr}(r)$, $T_{\theta\theta}(r)$, $T_{\phi\phi}(r)$ e quindi, ancora una volta, ad un gradiente di sforzo nullo all'interno dello sferoide.

3.2. Caso $\varphi_s(r)$ non omogeneo

Il secondo caso esaminato è risultato più complesso, in quanto se $\varphi_s(r)$ presenta un andamento variabile, l'equazione viene scritta come:

$$(r) \quad \frac{\partial}{\partial r}(\varphi_s(r) T_{rr}) + \frac{2}{r} \varphi_s(r) (T_{rr} - T_{\theta\theta}) = 0;$$

$$+ c. b: \begin{cases} u_r(r=0) = 0; \\ \varphi_s T_{rr}(r=R) = -P_{dextran} \end{cases}$$

Nello specifico, è stata scelta una $\varphi_s(r)$ con il seguente andamento:

$$\varphi_s(r) = \alpha r + \beta, \quad 0 < r < R_{ext}$$

con α e β costanti arbitrarie.

In questo caso, la soluzione non è calcolabile analiticamente; pertanto essa è stata ricavata attraverso una discretizzazione alle differenze finite, con i metodi descritti nel paragrafo 2.4.

Prima di passare al dominio discreto, sono stati svolti calcoli intermedi:

$$\varphi'_s T_{rr} + \varphi_s \frac{\partial T_{rr}}{\partial r} + \frac{2}{r} \varphi_s (T_{rr} - T_{\theta\theta}) = 0$$

Ricordando le equazioni di legame costitutivo, riportate nel capitolo precedente:

$$T_{rr} = (\lambda + 2\mu) \frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{2\lambda}{r} u_r;$$

$$T_{\theta\theta} = T_{\phi\phi} = \lambda \frac{\partial u_r}{\partial r} + 2(\lambda + \mu) \frac{u_r}{r};$$

l'equazione può essere sviluppata come:

$$\begin{aligned} \varphi'_s \left[(\lambda + 2\mu) \frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{2\lambda}{r} u_r \right] + \varphi_s \frac{\partial}{\partial r} \left[(\lambda + 2\mu) \frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{2\lambda}{r} u_r \right] \\ + \frac{2}{r} \varphi_s \left[(\lambda + 2\mu) \frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{2\lambda}{r} u_r - \lambda \frac{\partial u_r}{\partial r} + 2(\lambda + \mu) \frac{u_r}{r} \right] = 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \varphi'_s \left[(\lambda + 2\mu) \frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{2\lambda}{r} u_r \right] + \varphi_s (\lambda + 2\mu) \frac{\partial^2 u_r}{\partial r^2} + \frac{2\lambda}{r^2} \varphi_s u_r + \frac{2\lambda}{r} \varphi_s \frac{\partial u_r}{\partial r} \\ + \frac{2}{r} \varphi_s (\lambda + 2\mu) \frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{4\lambda}{r^2} \varphi_s u_r - \frac{2\lambda}{r} \varphi_s \frac{\partial u_r}{\partial r} + \frac{4(\lambda + \mu)}{r^2} \varphi_s u_r = 0 \end{aligned}$$

Raccogliendo i termini ed effettuando le dovute semplificazioni, si ottiene:

$$\varphi_s (\lambda + 2\mu) \frac{\partial^2 u_r}{\partial r^2} + (\lambda + 2\mu) \left[\varphi'_s + \frac{2\varphi_s}{r} \right] \frac{\partial u_r}{\partial r} + \left[\frac{2\lambda}{r} \varphi'_s - \frac{2(\lambda + 2\mu)}{r^2} \varphi_s \right] u_r = 0$$

Moltiplicando per il termine r^2 , ai fini della discretizzazione, si avrà l'equazione finale:

$$r^2 \varphi_s (\lambda + 2\mu) \frac{\partial^2 u_r}{\partial r^2} + (\lambda + 2\mu) [\varphi'_s r^2 + 2\varphi_s r] \frac{\partial u_r}{\partial r} + [2\lambda r \varphi'_s - 2(\lambda + 2\mu) \varphi_s] u_r = 0$$

$$+ c. b: \begin{cases} u_r(r = 0) = 0; \\ \varphi_s T_{rr}(r = R) = -P_{dextran} \end{cases}$$

Passando allo spazio discreto, come anticipato nel precedente capitolo, si è scelto di approssimare le derivate prima e seconda con degli schemi centrati.

In particolare, per un generico nodo n ($1 < n < N_h$), dove N_h rappresenta il numero di passi di incognite del dominio discreto monodimensionale ed h il passo di integrazione ($h = \frac{R_{ext}-R_0}{N_h}$), si otterrà:

$$\begin{aligned} R^2(n)\varphi_s(n)(\lambda + 2\mu) \frac{U_{n+1} - 2U_n + U_{n-1}}{h^2} \\ + [2R(n)\varphi_s(n) + R^2(n)\varphi'_s(n)](\lambda + 2\mu) \frac{U_{n+1} - U_{n-1}}{2h} \\ + [2\lambda\varphi'_s(n)R(n) - 2\varphi_s(n)(\lambda + 2\mu)]U_n = 0 \end{aligned}$$

dove U_n è la variabile discreta che rappresenta la variabile continua $u(r)$ nel nodo n collocato in $R(n) = h \cdot n$.

$R(n)$, $\varphi_s(n)$ e $\varphi'_s(n)$ rappresentano gli elementi di tre vettori ottenuti discretizzando rispettivamente le variabili r e $\varphi_s(r)$ e $\varphi'_s(r)$.

Raccogliendo i termini, l'equazione assume la forma seguente.

$$\begin{aligned} (\lambda + 2\mu) \left[\frac{\varphi_s(n)R^2(n)}{h^2} + \frac{R(n)}{h} \varphi_s(n) + \frac{\varphi'_s(n)R^2(n)}{2h} \right] U_{n+1} \\ + \left[2\lambda\varphi'_s(n)R(n) - 2\varphi_s(n)(\lambda + 2\mu) \left(\frac{R^2(n)}{h^2} + 1 \right) \right] U_n \\ + \left[\frac{\varphi_s(n)R^2(n)}{h^2} - \frac{R(n)}{h} \varphi_s(n) - \frac{\varphi'_s(n)R^2(n)}{2h} \right] U_{n-1} = 0 \end{aligned}$$

Il problema è stato risolto attraverso la soluzione del sistema lineare:

$$A\bar{U} = \bar{b}$$

nel quale A rappresenta una matrice tri-diagonale e \bar{b} è il vettore di termini noti, nullo nel caso in esame, tranne che nel nodo N_h per via delle condizioni al bordo; gli elementi di seguito riportati rappresentano rispettivamente i valori sulla diagonale principale, quelli sulla diagonale superiore e quelli sulla diagonale inferiore della matrice A .

$$A(n, n) = \left[2\lambda\varphi'_s(n)R(n) - 2\varphi_s(n)(\lambda + 2\mu) \left(\frac{R^2(n)}{h^2} + 1 \right) \right];$$

$$A(n, n + 1) = (\lambda + 2\mu) \left[\frac{\varphi_s(n)R^2(n)}{h^2} + \frac{R(n)}{h}\varphi_s(n) + \frac{\varphi'_s(n)R^2(n)}{2h} \right];$$

$$A(n, n - 1) = (\lambda + 2\mu) \left[\frac{\varphi_s(n)R^2(n)}{h^2} - \frac{R(n)}{h}\varphi_s(n) - \frac{\varphi'_s(n)R^2(n)}{2h} \right];$$

La condizione al bordo sull'estremo destro, è stata discretizzata come segue.

$$\varphi_s(R_{N_h}) \left[(\lambda + 2\mu) \frac{U_{Nh} - U_{Nh-1}}{h} + \frac{2\lambda}{R_{N_h}} U_{Nh} \right] = -P_{dextran}$$

da cui l'ultima riga del sistema tridiagonale si scrive come:

$$\left[\frac{(\lambda + 2\mu)}{h} + \frac{2\lambda}{R_{N_h}} \right] U_{Nh} - \frac{(\lambda + 2\mu)}{h} U_{Nh-1} = -\frac{P_{dextran}}{\varphi_s(R_{N_h})}$$

La condizione sull'altro estremo è stata discretizzata semplicemente come:

$$U_1 = 0;$$

Le condizioni al bordo sono state incluse nel sistema lineare inserendole come prima ed ultima riga del sistema, inserendo alcune correzioni sugli elementi della matrice A e del vettore \bar{b} .

$$A(1,1) = 1;$$

$$A(Nh, Nh - 1) = -\frac{(\lambda + 2\mu)}{h};$$

$$A(Nh, Nh) = \frac{(\lambda + 2\mu)}{h} + \frac{2\lambda}{R_{Nh}};$$

$$b(Nh) = -\frac{P_{dextran}}{\varphi_s(R_{Nh})}$$

Inoltre, occorre tenere presente che per il nodo $n=2$ figurerebbe nell'equazione il termine U_1 (corrispondente ad U_{n-1}), che non rappresenta più una variabile del sistema, ma un termine noto, dato dalla condizione al bordo. Effettuando i calcoli analiticamente, si ottiene:

$$(\lambda + 2\mu) \left[\frac{\varphi_s(2)R^2(2)}{h^2} + \frac{R(2)}{h} \varphi_s(2) + \frac{\varphi_s'(2)R^2(2)}{2h} \right] U_3 \left[2\lambda \varphi_s'(2)R(2) \right. \\ \left. - 2\varphi_s(2)(\lambda + 2\mu) \left(\frac{R^2(2)}{h^2} + 1 \right) \right] U_2 \\ + \left[\frac{\varphi_s(2)R^2(2)}{h^2} - \frac{R(2)}{h} \varphi_s(2) - \frac{\varphi_s'(2)R^2(2)}{2h} \right] U_1 = 0;$$

Portando il termine relativo ad U_1 a destra, in quanto termine noto si ha:

$$(\lambda + 2\mu) \left[\frac{\varphi_s(2)R^2(2)}{h^2} + \frac{R(2)}{h} \varphi_s(2) + \frac{\varphi_s'(2)R^2(2)}{2h} \right] U_3 \left[2\lambda \varphi_s'(2)R(2) \right. \\ \left. - 2\varphi_s(2)(\lambda + 2\mu) \left(\frac{R^2(2)}{h^2} + 1 \right) \right] U_2 \\ = \left[\frac{\varphi_s(2)R^2(2)}{h^2} - \frac{R(2)}{h} \varphi_s(2) - \frac{\varphi_s'(2)R^2(2)}{2h} \right] U_1;$$

Assumendo in questo caso il termine U_1 un valore nullo, non sono necessarie correzioni sul vettore \bar{b} del sistema, che sarebbero invece opportune nel caso di condizione al bordo sinistro non nulla.

La funzione Matlab[®], opportunamente implementata per la soluzione del suddetto sistema lineare, insieme ai comandi per richiamare la funzione e per stampare i grafici dello spostamento e degli sforzi in funzione della coordinata radiale r , vengono riportati nella sezione "Appendice".

3.3. Porosità che evolve nel tempo

Una volta calcolato l'andamento degli sforzi lungo il raggio dello sferoide per una frazione volumetrica solida che cresce con la coordinata radiale, si è ipotizzata una legge di evoluzione temporale per $\varphi_s(r, t)$. All'equazione di equilibrio delle forze, precedentemente implementata, è stata accoppiata un'equazione differenziale in tempo che legasse la variazione in tempo della frazione volumetrica della fase solida con la traccia del tensore degli sforzi nello stesso punto.

$$r^2 \varphi_s (\lambda + 2\mu) \frac{\partial^2 u_r}{\partial r^2} + (\lambda + 2\mu) [\varphi_s' r^2 + 2\varphi_s r] \frac{\partial u_r}{\partial r} + [2\lambda r \varphi_s' - 2(\lambda + 2\mu) \varphi_s] u_r = 0$$

$$+ c. b: \begin{cases} u_r(r = 0) = 0; \\ \varphi_s T_{rr}(r = R) = -P_{dextran} \end{cases}$$

$$\frac{d\varphi_s}{dt} = \gamma \cdot \varphi_s (trT - T^0)$$

dove T^0 rappresenta un valore target (eventualmente nullo) ed il termine γ è il tempo di abbattimento della funzione $\varphi_s(r, t)$; trT rappresenta la traccia del tensore degli sforzi, data dalla somma delle componenti sulla diagonale principale:

$$trT = T_{rr} + T_{\theta\theta} + T_{\phi\phi} = T_{rr} + 2 \cdot T_{\theta\theta};$$

Si è scelto di utilizzare la traccia del tensore, in quanto non è noto dagli esperimenti quale sforzo influenzi prevalentemente la frazione volumetrica.

Secondo questa legge si è ipotizzato che la frazione volumetrica evolva nel tempo in funzione degli sforzi ed in particolare ci si aspetterebbe che, all'aumentare di questi, in modulo, la frazione volumetrica si riduca.

Si osserva come i segni delle componenti sulla diagonale principale del tensore degli sforzi siano sempre negativi e concordi fra loro.

L'equazione di evoluzione di φ_s è stata discretizzata attraverso i metodi di Eulero avanti ed Eulero indietro, per controllare eventuali condizioni di instabilità.

$$EA: \frac{\varphi_s^{j+1} - \varphi_s^j}{\Delta t} = \varphi_s^j (trT^j - T^0);$$

$$\varphi_s^{j+1} = \varphi_s^j [1 + \Delta t (trT^j - T^0)]$$

$$EI: \frac{\varphi_s^{j+1} - \varphi_s^j}{\Delta t} = \varphi_s^{j+1} (trT^{j+1} - T^0);$$

$$\varphi_s^{j+1} = \varphi_s^j \frac{1}{1 - \Delta t (trT^{j+1} - T^0)}$$

Si riporta nella sezione “Appendice” l'implementazione di questo schema con il metodo di Eulero indietro; dal momento che l'intervallo di discretizzazione utilizzato è stato abbastanza piccolo, l'impiego di un metodo rispetto all'altro è risultato ininfluenza ai fini della stabilità e in termini di risultato finale ottenuto.

3.4. Evoluzione del volume nel tempo

Oltre all'evoluzione temporale della frazione solida si è implementata un'equazione di evoluzione nel tempo del volume dello sferoide, tenendo conto del fatto che, ad ogni istante, lo sferoide modifica le sue dimensioni per via della crescita modulata dall'azione delle forze di compressione. L'equazione implementata è un'equazione di conservazione della massa e permette di calcolare il volume come somma di tutte le aree delle corone circolari su tutto il dominio spaziale (Figura 9) :

$$\frac{4\pi}{3} R^3(t) = \frac{\int_0^{2\pi} \int_0^\pi \int_0^{R(t)} r^2 \sin(\theta) \varphi_s(r, t) dr d\psi d\theta}{\varphi_0}$$

dove r è la coordinata radiale e φ_0 il valore del vettore φ_s in corrispondenza di $r = R_0$.

Secondo questa legge, il raggio dello sferoide cresce in modo da raggiungere il valore che avrebbe se tutta la frazione volumetrica della parte solida fosse quella di equilibrio φ_0 .

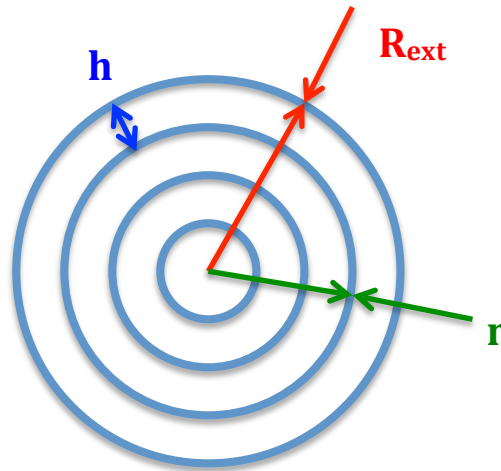


Figura 9. Sferoide diviso in corone circolari di distanza h fra loro.

La discretizzazione è stata effettuata nel seguente modo:

$$R(N_h) = \left(3 * 2\pi * \frac{\text{sum}(R(1:N_h)^2 \cdot \varphi_s(1:N_h) \cdot h)}{\varphi_0} \right)^{\frac{1}{3}}$$

4. Risultati e discussione

In questo capitolo sono illustrati e descritti in modo critico i risultati di previsione di crescita di uno sferoide tumorale ottenuto sulla base dei modelli teorici introdotti nel capitolo precedente. L'obiettivo è quello di riprodurre, grazie all'applicazione del modello enunciato, quanto osservato sperimentalmente circa il comportamento meccanico dello sferoide tumorale sottoposto ad un carico esterno.

In primo luogo si riportano gli andamenti di spostamento, sforzo radiale e sforzo circonferenziale per un generico istante ed in funzione della coordinata radiale, al fine di verificare l'effettiva disomogeneità tra centro e periferia dello sferoide.

Successivamente si analizzano le evoluzioni spaziali e temporali delle variabili $\varphi_s(r, t)$, $u(r, t)$, $T_{\theta\theta}(r, t)$ e $T_{rr}(r, t)$ in tre condizioni di carico esterno:

- Carico nullo: sferoide libero di crescere;
- Carico pari a 1 KPa;
- Carico pari a 10 KPa.

Una volta analizzati singolarmente i tre casi, si confrontano gli andamenti temporali dei volumi, verificando come l'entità del carico influenza la crescita dello sferoide.

Infine, per verificare l'indipendenza del modello dal dato iniziale $\varphi_s(r)$, imposto arbitrariamente, si effettua un confronto con il caso φ_s costante.

4.1. Disomogeneità radiale della frazione volumetrica $\varphi_s(\mathbf{r})$

Si riporta in Figura 10 l'andamento dello spostamento u della parte solida in funzione della coordinata radiale.

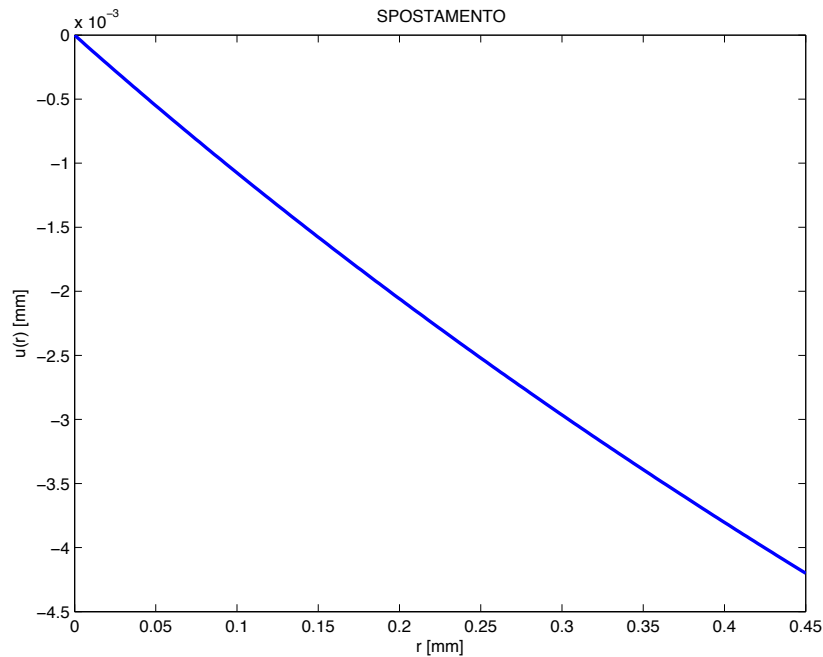


Figura 10. Spostamento u [mm] nel caso φ_s lineare assegnato.

Dalla Figura 10, si evince come lo spostamento u dipenda linearmente dalla coordinata radiale.

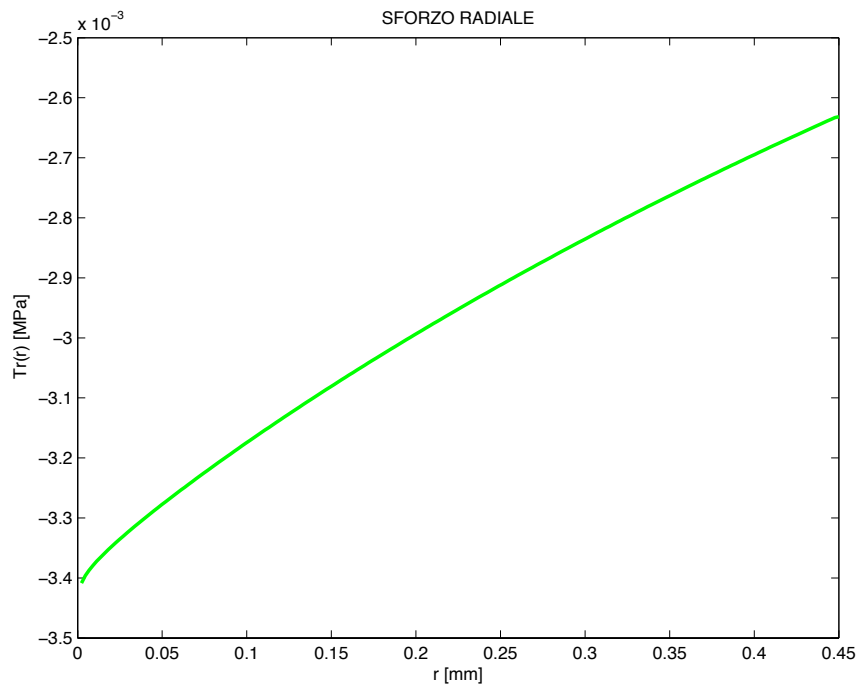


Figura 11. Sforzo radiale T_{rr} [MPa] per φ_s lineare assegnato.

Per quanto riguarda l'andamento dello sforzo radiale della componente solida in funzione di r , riportato in Figura 11, si osserva come esso non sia costante, ma risulti maggiore in modulo nel centro dello sferoide ($r=0$), corrispondentemente ad una maggiore compressione in quest'area e come esso si riduca all'aumentare del raggio sino a raggiungere il valore assegnato al bordo. Il risultato ottenuto è coerente con le osservazioni sperimentali; infatti si era ipotizzato che l'incremento dell'apoptosi al centro dello sferoide, in contrasto con la mitosi inalterata nella zona periferica, fosse dovuta ad una differente distribuzione dello sforzo lungo il raggio e che, in particolare, tale sforzo risultasse maggiore (in modulo) al centro dello sferoide e decrescesse (in modulo) allontanandosi da esso.

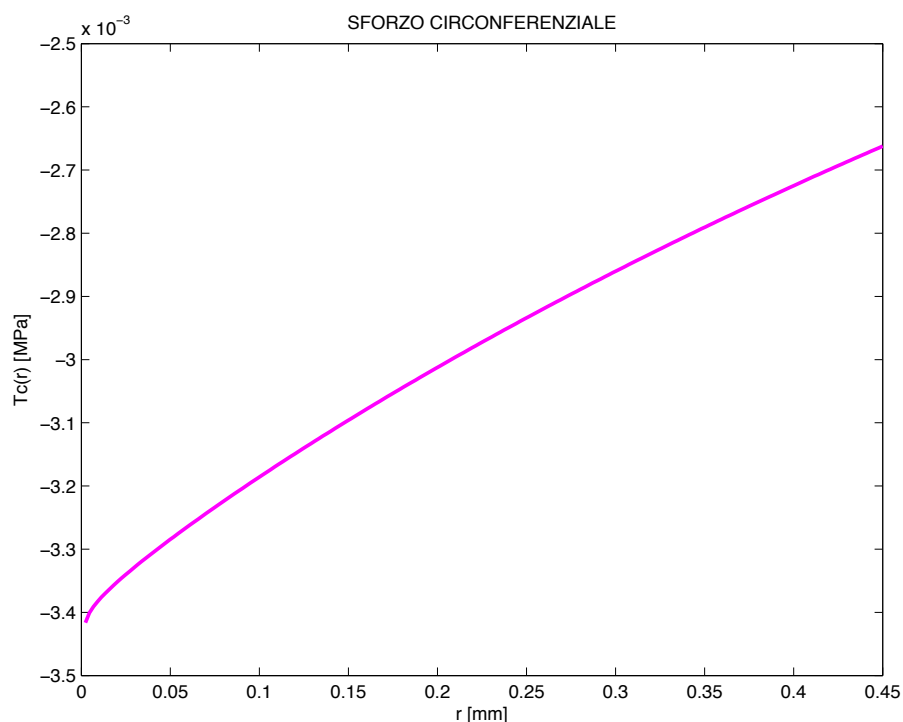


Figura 12. Sforzo circonferenziale $T_{\theta\theta}$ [MPa] nel caso φ_s lineare assegnato.

Analogamente a quanto ottenuto per lo sforzo radiale, anche lo sforzo circonferenziale risulta maggiore in modulo al centro e decrescente (in modulo) verso il bordo (Figura 12), rappresentando ancora una volta il risultato sperimentale ottenuto da Montel et al. In questo caso $T_{\theta\theta}$ al bordo non è fissato da nessuna condizione.

4.2. Evoluzione temporale: carico esterno pari a 1 KPa

Una volta costruito il modello, si sono ricavati i grafici in tempo e spazio delle variabili d'interesse nel caso di carico esterno pari a 1 KPa, attraverso i comandi riportati nella sezione "Appendice".

In primo luogo, in Figura 13 si riporta l'andamento della coordinata radiale in funzione del tempo, che come si nota, cresce esponenzialmente sino a raggiungere un valore di 1.3 mm.

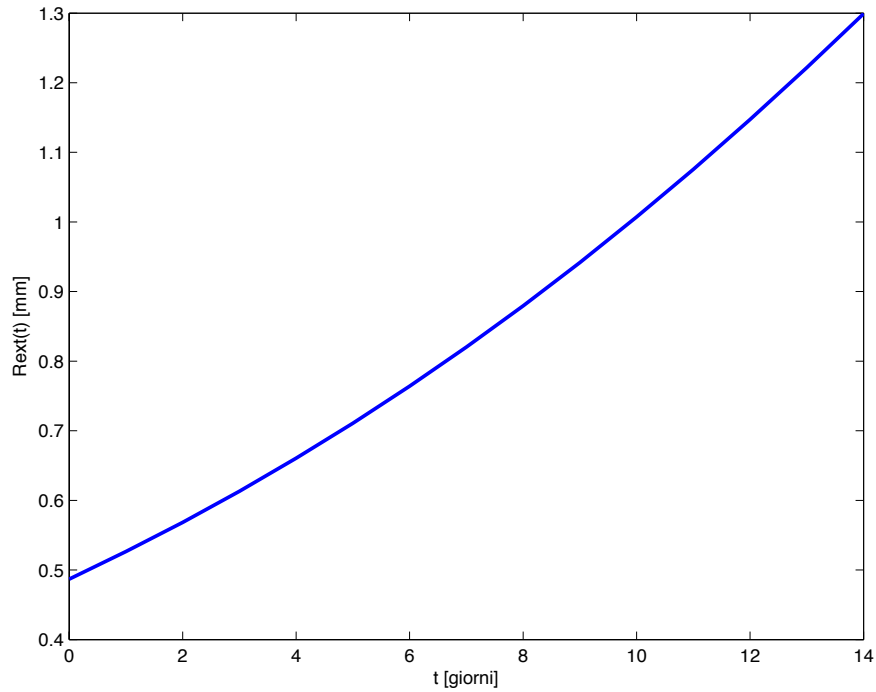


Figura 13. Andamento del raggio dello sferoide in funzione del tempo nel caso di carico pari a 1 KPa.

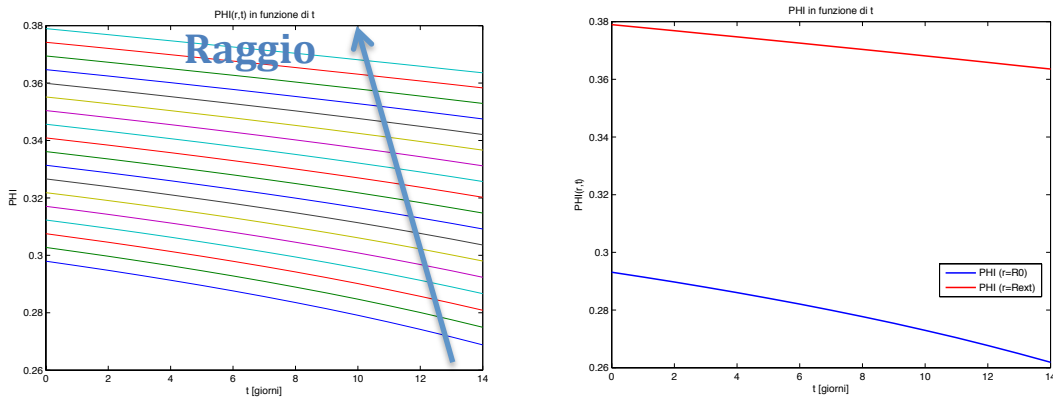


Figura 14. SINISTRA: modello con frazione volumetrica solida che evolve nel tempo; DESTRA: andamento della frazione volumetrica in funzione del tempo in corrispondenza del nodo 1 (curva blu) e del nodo N_n (curva rossa).

La curva blu in basso, in Figura 14 (sinistra), rappresenta la frazione volumetrica calcolata in corrispondenza del valore $n=1$; gli andamenti ai passi successivi evolvono dal basso verso l'alto.

Si osserva pertanto, per tutti i nodi del dominio spaziale, un andamento decrescente di φ_s in funzione del tempo ed in particolare la pendenza è la medesima nei nodi iniziale e finale del dominio spaziale, ma con valori superiori in quest'ultimo (Figura 14 destra):

- Nodo $n=1$: andamento lineare decrescente nell'intorno del punto 0.3;
- Nodo $n=N_h$: andamento lineare decrescente nell'intorno del punto 0.38.

Questi diversi valori di frazione volumetrica in corrispondenza delle estremità del dominio spaziale (maggiori nel nodo $n=N_h$), potrebbero spiegare la diversa distribuzione del carico tra il centro e la periferia dello sferoide. Infatti, una maggiore frazione volumetrica solida al bordo dello sferoide si traduce in un maggior numero di cellule in questa zona; d'altro canto, una φ_s ridotta in corrispondenza del centro equivale ad una minore componente solida (cellule) in quest'area.

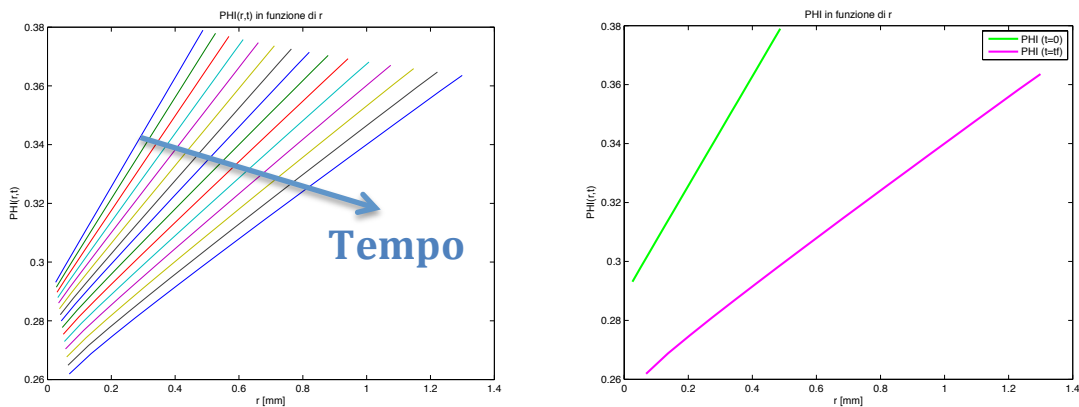


Figura 15. SINISTRA: modello a frazione volumetrica solida che evolve lungo il raggio; DESTRA: andamento della frazione volumetrica in funzione della coordinata radiale in corrispondenza dell'istante iniziale (curva verde) e finale (curva rosa).

Dal grafico in Figura 15 (sinistra) viene evidenziato come la funzione φ_s presenti valori inferiori in corrispondenza del centro dello sferoide, e come questi valori aumentino in corrispondenza del bordo esterno, confermando quanto osservato sperimentalmente.

Attraverso questo grafico è inoltre possibile osservare la crescita del raggio in funzione del tempo.

Osservando l'evoluzione temporale della frazione volumetrica solida φ_s , rappresentata in Figura 15 (sinistra) da sinistra verso destra, si nota come la sua pendenza, in funzione della

coordinata radiale, diminuisca al crescere del tempo. Questo risultato si potrebbe tradurre in una ridotta velocità di crescita dello sferoide, dovuta probabilmente ad un aumento, in modulo, degli sforzi radiali e circonferenziali nel tempo, come riportato nei grafici successivi. Secondo questa ipotesi, tale aumento rallenterebbe la crescita dello sferoide nel tempo per via della maggiore compressione esercitata.

Inoltre i valori di φ_s risultano decrescenti in funzione del tempo, coerentemente con quanto osservabile in Figura 14 (sinistra).

A conferma di quanto affermato, si riportano in Figura 15 (destra) gli andamenti della $\varphi_s(r)$ agli istanti iniziale (verde) e finale (rosa).

Si riportano di seguito i grafici dello sforzo circonferenziale.

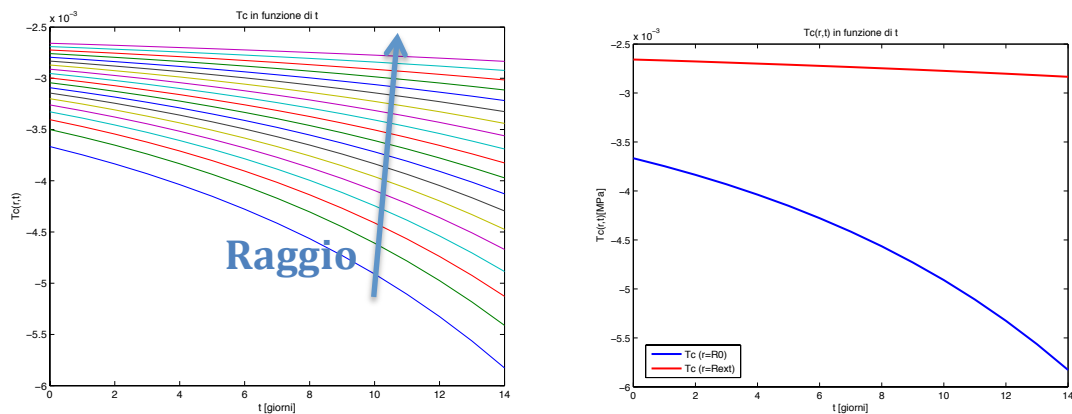


Figura 16. SINISTRA: andamento di $T_{\theta\theta}$ [MPa] in funzione del tempo; DESTRA: andamento dello sforzo circonferenziale in funzione del tempo in corrispondenza del primo nodo spaziale (blu) e dell'ultimo nodo spaziale (rosso).

In Figura 16 (sinistra) si osserva un andamento dello sforzo circonferenziale decrescente, e pertanto crescente in modulo, all'aumentare del tempo. Come discusso precedentemente, questo comporta una maggiore compressione dello sferoide nel tempo e potrebbe rallentarne la crescita.

L'evoluzione in funzione del raggio è osservabile dal basso verso l'alto.

In particolare, come evidenziato in Figura 16 (destra), nel nodo finale N_h (curva rossa), in corrispondenza del bordo dello sferoide, lo sforzo raggiunge valori inferiori, in modulo, rispetto al nodo iniziale.

Questo risultato è coerente con quanto osservato sperimentalmente, in quanto lo sforzo risulta massimo nel centro dello sferoide, favorendo l'apoptosi.

Questo aspetto è maggiormente evidenziato in Figura 17, dove l'andamento di $T_{\theta\theta}$ in funzione del raggio risulta crescente al crescere della coordinata radiale, e pertanto decrescente in modulo.

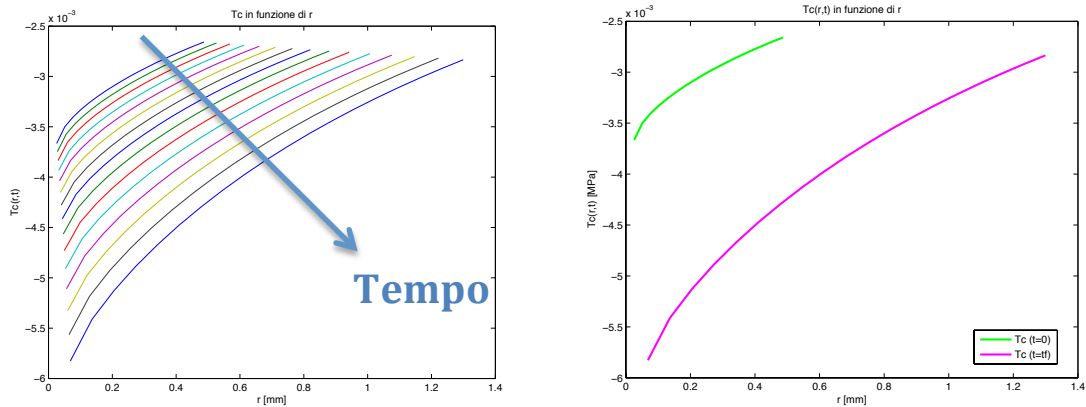


Figura 17. SINISTRA: andamento di T_c [MPa] in funzione della coordinata r [mm]; DESTRA: andamento di T_c in funzione di r all'istante iniziale (verde) e finale (rosa)

In questo grafico, $T_{\theta\theta}(r)$ evolve temporalmente dall'alto verso il basso, mantenendo la stessa pendenza.

La Figura 17 evidenzia un andamento decrescente di $T_{\theta\theta}$ in funzione del tempo, e quindi crescente in modulo, coerentemente con quanto ottenuto in Figura 16.

In Figura 18 vengono riportati i grafici relativi agli andamenti dello sforzo in direzione radiale (T_{rr}).

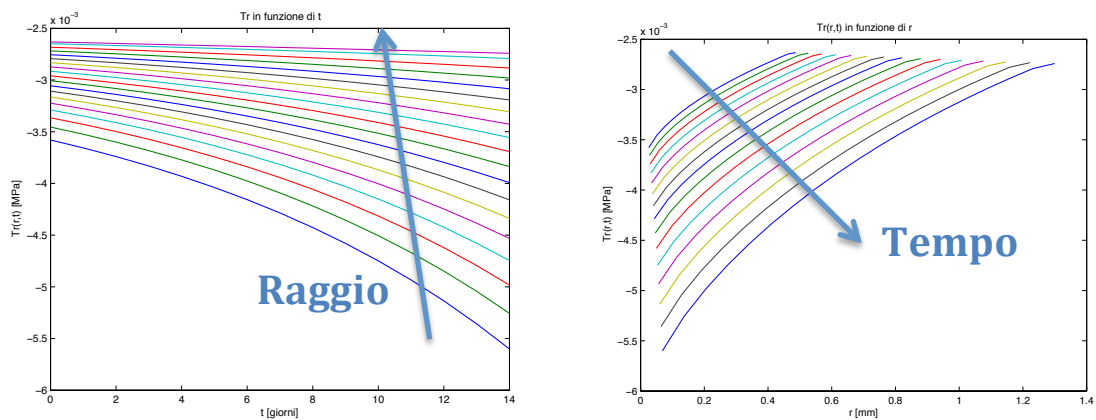


Figura 18. Andamento di T_r [MPa] in funzione del tempo (sinistra) e della coordinata radiale (destra).

Tali andamenti, sia in funzione del tempo (Figura 18 sinistra) che in funzione della coordinata radiale (Figura 18 destra), risultano analoghi a quelli ottenuti per lo sforzo circonferenziale, presentando ragionevolmente valori assoluti differenti.

La differenza si presenta al bordo destro, dove viene raggiunto il valore fissato, imposto dalla condizione al contorno.

La Figura 19 rappresenta gli andamenti dello spostamento della parte solida dello sferoide in funzione rispettivamente del tempo e della coordinata r .

Questi risultati sono interessanti se confrontati con l'andamento ottenuto per φ_s , in quanto l'equazione:

$$\frac{d\varphi_s}{dt} = \gamma \cdot \varphi_s (trT - T^0)$$

prevede che ad una crescita nel tempo (in modulo) degli sforzi $T_{\theta\theta}$ e T_{rr} e, di conseguenza, della funzione trT , corrisponda una diminuzione della pendenza della funzione φ_s , dal momento che il valore target T^0 impostato è costante e negativo ($T^0 = -5 * 10^{-3} MPa$).

Infatti:

- $0 < \varphi_s < 1$;
- $\gamma > 0$;
- $-T^0 > 0$: sempre costante e maggiore di 0;
- $trT - T^0 < 0$: trT decresce al crescere del tempo (gli sforzi decrescono nel tempo, aumentando in modulo) e risulta sempre maggiore del valore target impostato.
- $\frac{d\varphi_s}{dt} < 0$: decrescente in funzione del tempo.

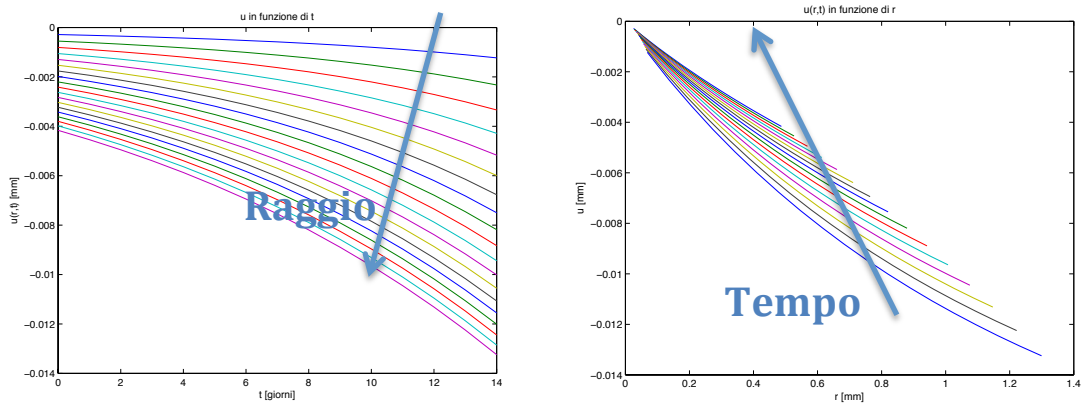


Figura 19. Andamento di u [mm] in funzione del tempo (sinistra) e della coordinata radiale (destra).

Come evidenziato in Figura 19 (sinistra), l'andamento dello spostamento risulta decrescente al variare del tempo; tale aspetto è deducibile anche in Figura 19 (destra), dove l'evoluzione temporale è rappresentato dal basso verso l'alto.

Lo spostamento è inoltre decrescente in funzione del raggio e pertanto crescente in modulo.

Di seguito (Figure 20 e 21) si riportano, per completezza, i grafici tridimensionali delle quattro variabili, in funzione del tempo (asse destro) e della coordinata radiale (asse sinistro).

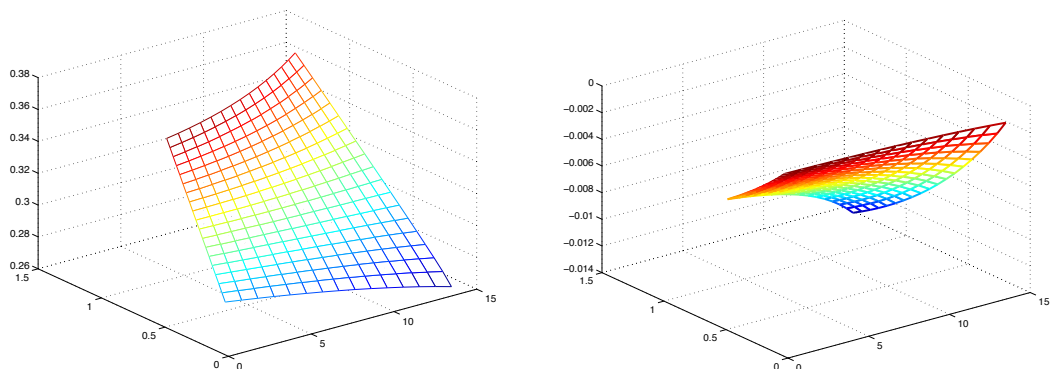


Figura 20. Grafico 3D di φ_s (sinistra) ed u (destra), in funzione del tempo (asse destro) e della coordinata radiale [mm] (asse sinistro).

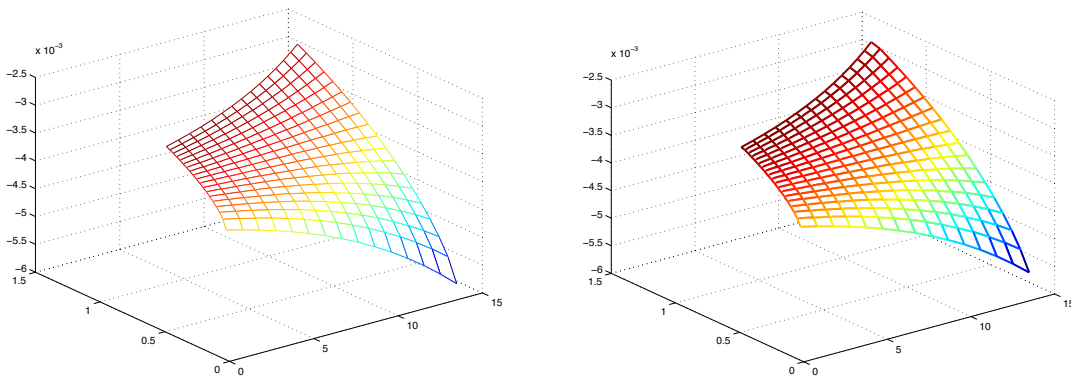


Figura 21. Grafico 3D di $T_{\theta\theta}$ [MPa] (sinistra) e T_{rr} [MPa] (destra) in funzione del tempo (asse destro) e della coordinata r [mm] (asse sinistro).

I grafici precedenti confermano i risultati ottenuti. Riepilogando:

- Andamento decrescente di $\varphi_s(r,t)$ in funzione del tempo e crescente in funzione della coordinata radiale (Figura 20 sinistra);
- Andamento decrescente di $T_{\theta\theta}$ e T_{rr} in funzione del tempo e crescente in funzione del raggio (Figura 21);
- Andamento decrescente dello spostamento della parte solida u in funzione del tempo e della coordinata radiale (Figura 20 destra).

4.3. Evoluzione temporale: carico esterno nullo

L'andamento del raggio dello sferoide in funzione del tempo nel caso di carico esterno nullo è riportato in Figura 22.

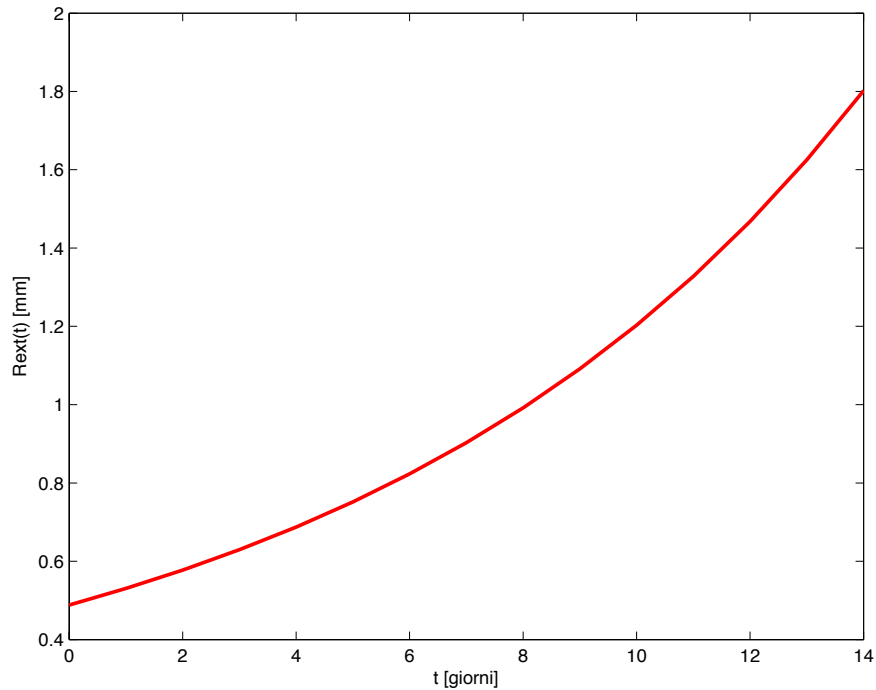


Figura 22. *Andamento del raggio dello sferoide in funzione del tempo nel caso di carico esterno nullo.*

Anche in questo caso il raggio presenta un andamento di tipo esponenziale, ma il valore finale raggiunto risulta circa pari a 1.8 mm. Ragionevolmente, nel caso in cui non venga imposto un carico esterno, lo sferoide cresce più liberamente rispetto a quando è sottoposto ad un carico.

Analogamente al caso di carico esterno pari ad 1 KPa, si sono ricavati i grafici per la frazione volumetrica $\varphi_s(r,t)$, in tempo e spazio.

La Figura 23 (sinistra), raffigurante l'andamento temporale, evidenzia una crescita della φ_s in funzione del tempo; andamento opposto a quello ottenuto nel caso di applicazione del carico.

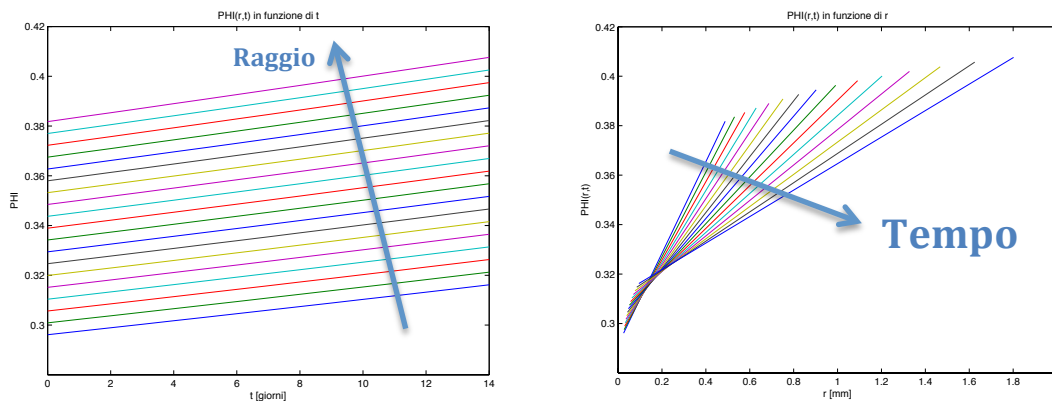


Figura 23. SINISTRA: andamento di φ_s in funzione del tempo nel caso di carico imposto nullo; DESTRA: andamento della φ_s in funzione della coordinata radiale nel caso di carico nullo.

Questo risultato è coerente con quanto osservato sperimentalmente, perché in questa condizione lo sferoide è lasciato libero di crescere.

In Figura 23 (destra) si osserva invece il medesimo trend ricavato nel caso di carico diverso da 0, ossia un andamento di φ_s crescente in funzione della coordinata radiale, con diminuzione della pendenza al crescere del tempo (evoluzione temporale da sinistra a destra).

Tuttavia i valori raggiunti dalla φ_s in corrispondenza dell'istante finale risultano maggiori nel caso di carico assente. Si può pertanto dedurre che la velocità di crescita dello sferoide sia ridotta anche nel caso di carico nullo, ma che lo sia meno rispetto al caso in cui venga imposto un carico di compressione di 1 KPa.

Questo risultato è ragionevole, considerando che nel caso in cui non venga imposto nessun carico di compressione sullo sferoide, la frazione volumetrica solida presente risulterà maggiore.

Per quanto riguarda gli sforzi, nel caso in cui non venga applicato un carico, questi risultano ragionevolmente nulli in tutte le direzioni.

4.4. Evoluzione temporale: carico esterno pari a 10 KPa

Nel caso in cui il carico esterno imposto sia di 10 KPa, l'andamento della crescita è differente. Come si osserva in Figura 24, il raggio dello sferoide sembra crescere

linearmente, e non più esponenzialmente come i casi precedenti, sino a raggiungere un plateau, per poi decrescere nuovamente. Occorre inoltre notare, che il valore raggiunto all'istante finale (tendente a 0) risulti inferiore a quello ottenuto nei casi di carico nullo e pari a 1 KPa.

Come ci si aspetterebbe intuitivamente, in queste condizioni di carico, lo sferoide cresce meno rapidamente e dopo un certo tempo tende decrescere.

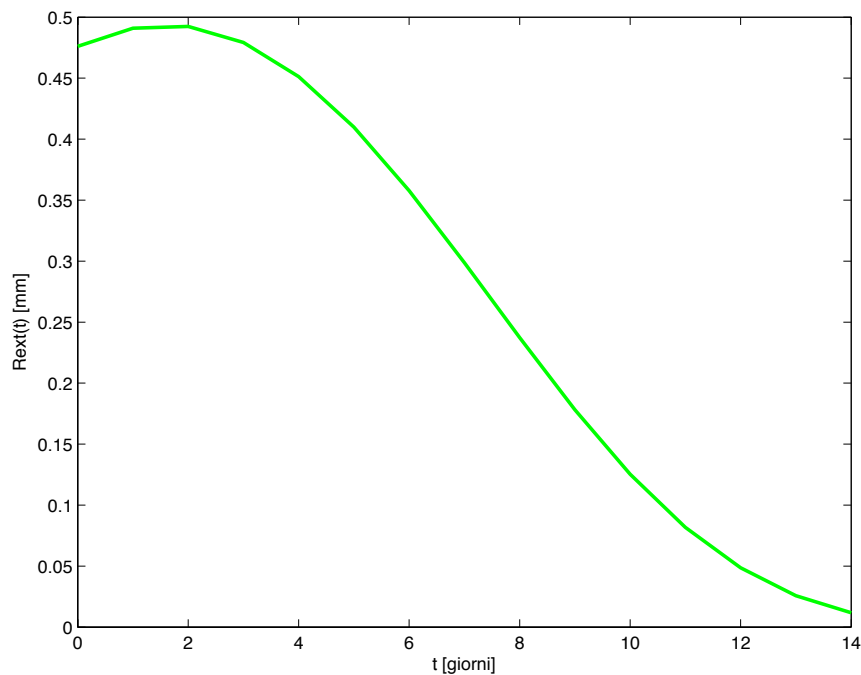


Figura 24. Andamento del volume in funzione del tempo, nel caso di carico esterno pari a 10 KPa.

In Figura 25 (sinistra) si osserva l'andamento di φ_s in funzione del tempo. Anche in questo caso la frazione volumetrica solida decresce col tempo, ma più rapidamente (pendenza maggiore) rispetto ai casi di carico nullo o inferiore in modulo. Questo risultato è ragionevole, dal momento che il carico imposto sullo sferoide è superiore in modulo e pertanto la velocità di crescita risulterà ulteriormente ridotta.

L'andamento è inoltre il medesimo, ma con valori assoluti diversi, in funzione della coordinata radiale.

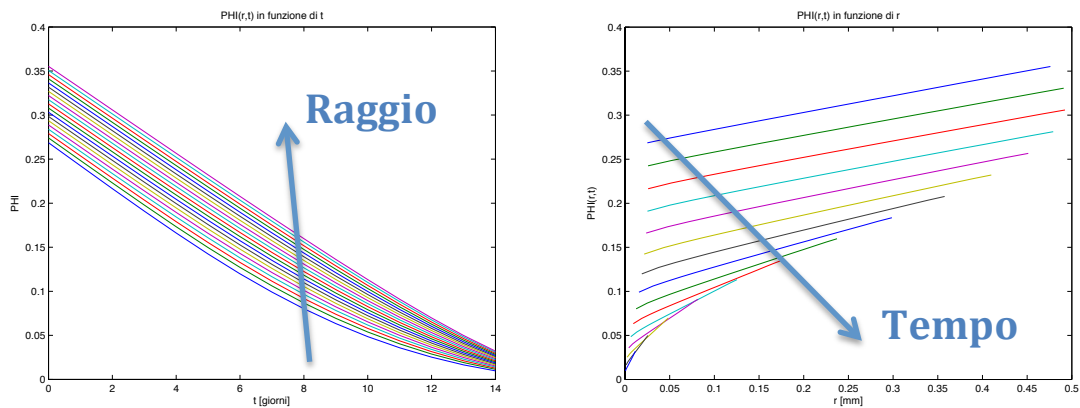


Figura 25. SINISTRA: frazione volumetrica che evolve nel tempo nel caso di carico di compressione pari a 10 KPa; DESTRA: frazione volumetrica in funzione di r nel caso di carico di compressione pari a 10 KPa.

Dall'andamento in funzione della coordinata radiale, rappresentato in Figura 25 (destra), si osserva nuovamente una riduzione della pendenza in funzione del tempo ed un andamento crescente dal centro alla periferia dello sferoide.

Per quanto riguarda gli sforzi circonferenziali e radiali, essi presentano fra loro gli stessi andamenti in funzione del tempo (Figure 26 e 27 sinistra) e della coordinata radiale (26 e 27 destra). In particolare l'andamento è di nuovo decrescente in funzione del tempo e crescente (decrescente in modulo) dal centro alla periferia. Tuttavia, rispetto ai casi di carico nullo o pari a 1 KPa, le velocità di crescita dello sforzo (decrescita in modulo) sono inferiori (pendenza minore nelle curve).

Questi risultati dimostrano come l'applicazione di un carico di entità superiore, in modulo, non modifichino l'andamento della crescita, ma ne modifichino la velocità, rallentandola e facendo ridurre (in modulo) meno rapidamente gli sforzi.

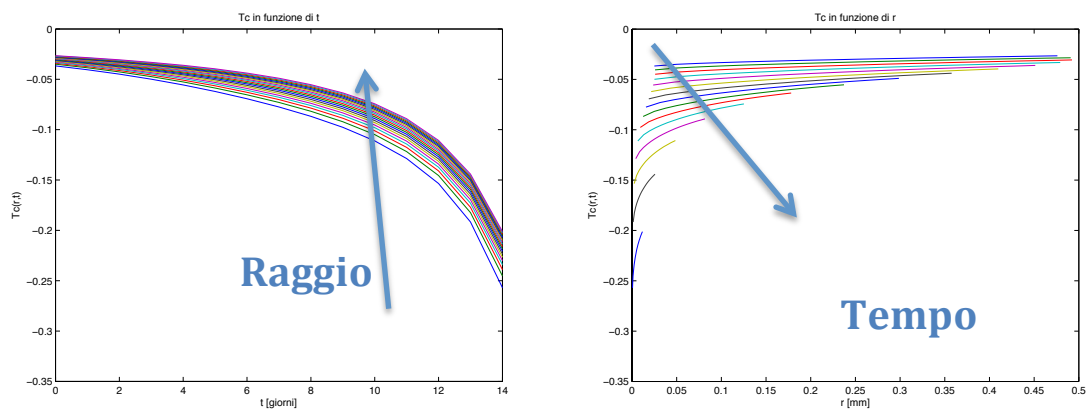


Figura 26. SINISTRA: sforzo circonferenziale in funzione del tempo nel caso di carico esterno di compressione pari a 10 KPa; DESTRA: sforzo circonferenziale in funzione del raggio nel caso di carico esterno di compressione pari a 10 KPa.

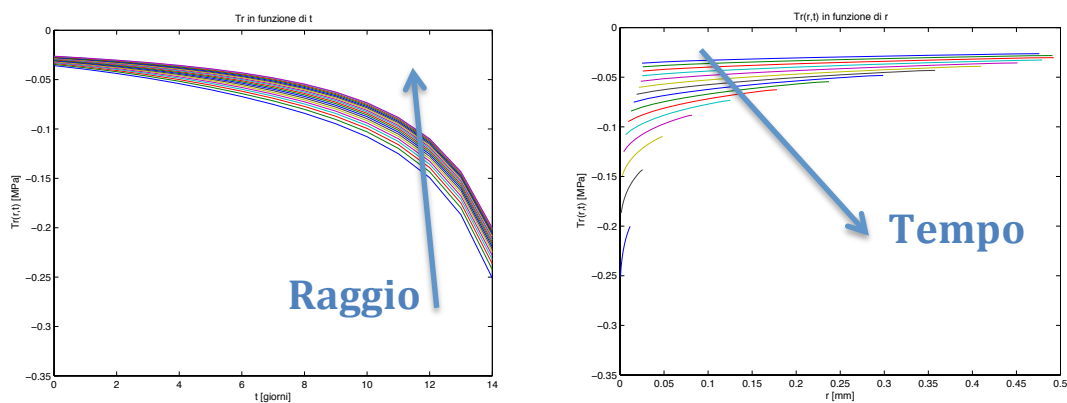


Figura 27. SINISTRA: sforzo radiale in funzione del tempo nel caso di carico esterno di compressione pari a 10 KPa; DESTRA: sforzo radiale in funzione del raggio nel caso di carico esterno di compressione pari a 10 KPa.

4.5. Confronto

In questo paragrafo si riporta un confronto tra i valori e gli andamenti ottenuti nelle diverse condizioni di carico.

In Figura 28 si possono osservare i diversi andamenti temporali del raggio dello sferoide al variare del carico.

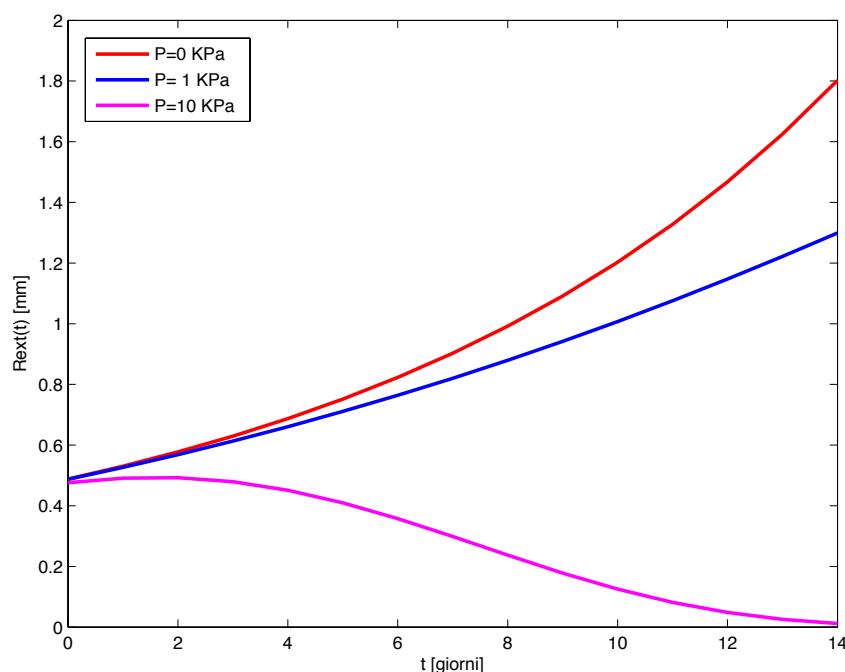


Figura 28. Andamenti del raggio dello sferoide in funzione del tempo nei 3 casi: carico nullo (rosso), carico pari a 1 KPa (blu) e carico pari a 10 KPa (rosa).

Come già osservato dall’analisi dei casi isolati, per condizioni di carico assente o pari a 1 KPa l’andamento risulta esponenziale crescente, mentre nel caso di carico pari a 10 KPa, il raggio cresce in maniera lineare sino a raggiungere uno stato stazionario.

In *Tabella 1* si riportano i valori di raggio finale raggiunti nei tre casi.

Tabella 1. Raggi finali per le tre diverse condizioni di carico.

	P=0 [KPa]	P=1 [KPa]	P=10 [KPa]
<i>Raggio finale [mm]</i>	1.80	1.30	0.01

Come riportato in tabella, nel caso di carico pari a 10 KPa il valore finale raggiunto risulta inferiore.

In *Figura 29* si riportano gli andamenti del volume normalizzato, in funzione del tempo, per diversi carichi applicati (0, 1, 2, 10 e 20 KPa).

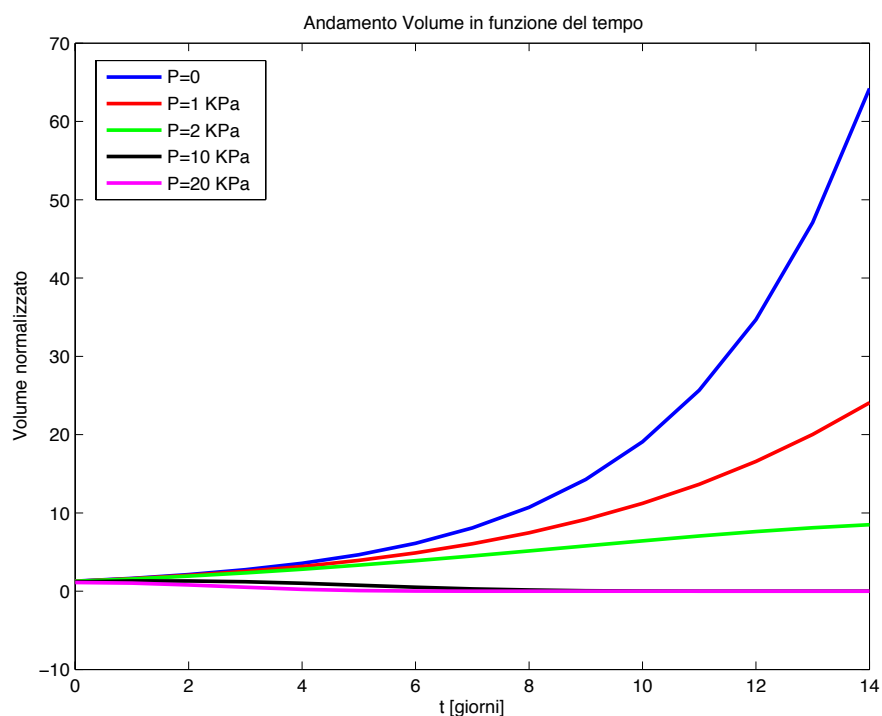


Figura 29. Andamenti del volume (normalizzato) in funzione del tempo per diversi carichi imposti: 0 KPa (blu), 1 KPa (rosso), 2 KPa (verde), 10 KPa (nero), 20 KPa (rosa).

Dai grafici si osserva come il volume dello sferoide aumenti meno rapidamente quando questo è sottoposto a carico; ed in particolare come la velocità di crescita diminuisca al crescere, in modulo, del carico di compressione.

Confrontando il grafico ottenuto con le curve sperimentali riportate da Montel et al. [8] (Figura 30), si osserva come la simulazione numerica riproduca qualitativamente gli andamenti di crescita osservati sperimentalmente.

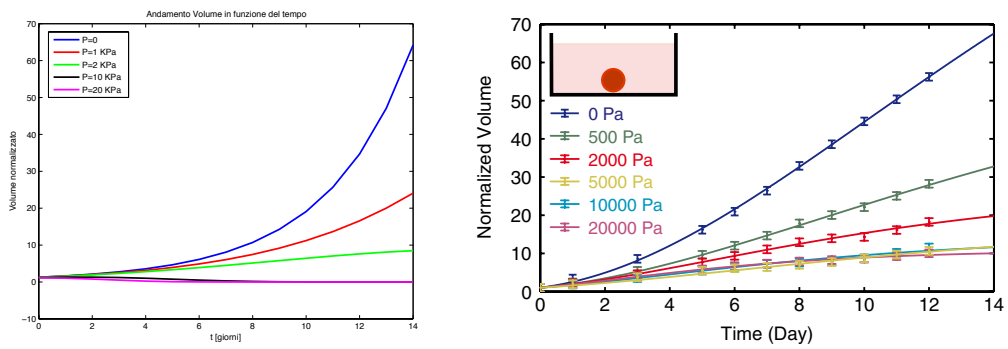


Figura 30. SINISTRA: andamento dei volumi dalle simulazioni numeriche; DESTRA: andamenti dei volumi dalle prove sperimentali [8].

Questo risultato conferma ancora una volta l'adeguatezza del modello nella rappresentazione qualitativa delle osservazioni sperimentali.

4.6. Confronto caso lineare VS costante

Per verificare la robustezza del modello e la significatività dei risultati ottenuti, si è effettuato un confronto con il caso φ_s costante, considerando in particolare:

$$\varphi_s = 0.47$$

Con procedimento analogo a quello effettuato per il caso lineare, si sono ricavati gli andamenti di φ_s , $T_{\theta\theta}$, T_{rr} ed u in funzione del tempo e della coordinata radiale.

In Figura 31 (sinistra) si evidenzia un andamento decrescente della frazione volumetrica in funzione del tempo, analogamente a quanto ottenuto nel caso di φ_s non omogenea, ma con una pendenza maggiore.

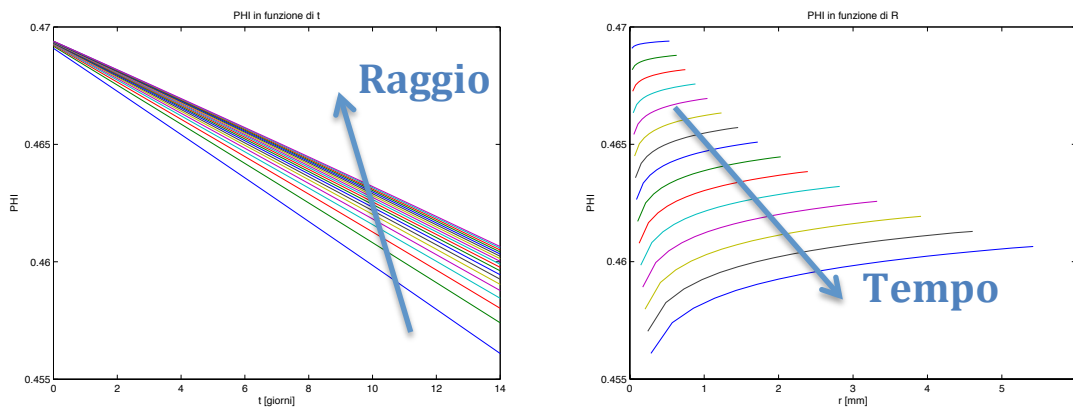


Figura 31. SINISTRA: andamento della φ_s in funzione del tempo [s]. L'evoluzione lungo il raggio è visibile dal basso verso l'alto; **DESTRA:** andamento della φ_s in funzione di r [mm]. L'andamento temporale è visibile dall'alto verso il basso.

In Figura 31 (destra) si osserva un andamento crescente in funzione della coordinata radiale (maggiore frazione solida al centro e minore alla periferia), in analogia con quanto osservato per il caso non omogeneo. In oltre è deducibile, leggendo l'andamento temporale dall'alto verso il basso, una diminuzione del valore assoluto di φ_s nel tempo.

Gli andamenti di sforzo circonferenziale e radiale risultano decrescenti nel tempo e crescenti (decrescenti in modulo) spostandosi dal centro verso la periferia dello sferoide, in accordo col caso non omogeneo.

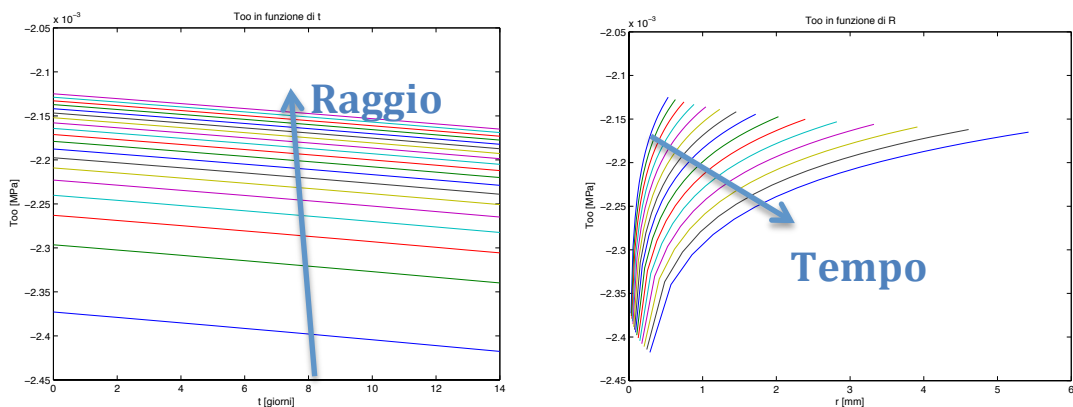


Figura 32. SINISTRA: andamento della $T_{\theta\theta}$ [MPa] in funzione del tempo [s]. L'evoluzione lungo il raggio è visibile dal basso verso l'alto; **DESTRA:** andamento della $T_{\theta\theta}$ [MPa] in funzione di r [mm]. L'andamento temporale è visibile da sinistra verso destra.

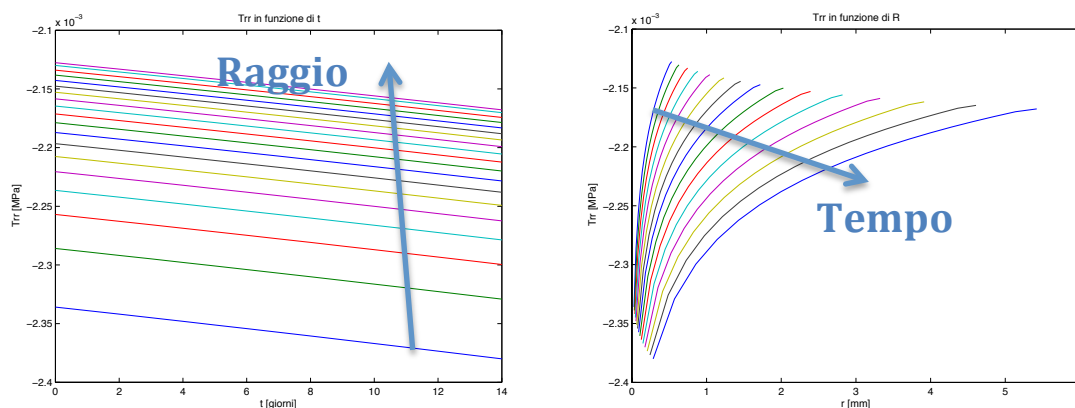


Figura 33. SINISTRA: andamento di T_{rr} [MPa] in funzione del tempo [s]. L'evoluzione lungo il raggio è visibile dal basso verso l'alto; DESTRA: andamento di T_{rr} [MPa] in funzione di r [mm]. L'andamento temporale è visibile da sinistra verso destra.

In conclusione, si può affermare che gli andamenti delle variabili di interesse non dipendano dall'andamento della φ_s iniziale, scelto arbitrariamente. Infatti sia nel caso di φ_s omogenea che nel caso disomogeneo, seppur con valori assoluti differenti, si ottengono degli andamenti della frazione volumetrica e degli sforzi (in modulo) crescenti dal centro verso la periferia dello sferoide, a conferma dei dati sperimentali di partenza [8].

5. Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato la ricerca di un modello matematico che descrivesse la meccanica dello sferoide tumorale e il suo accoppiamento con la crescita. In particolare si è cercato di riprodurre i risultati sperimentali ottenuti dal gruppo di Montel et al. tramite simulazioni numeriche, al fine di valutare l'effettiva adeguatezza del modello nella descrizione del problema.

L'ipotesi fondamentale è che una distribuzione non omogenea della componente solida lungo la direzione radiale dia origine ad una disomogeneità della componente dello sforzo dovuta alla fase solida, che, con un feedback mecano-biologico, influenzi il tasso di apoptosi e quindi l'evoluzione nel tempo del diametro dell'aggregato cellulare.

Il risultato atteso è una variazione dello sforzo e della crescita tra il centro e la periferia dello sferoide; avendo Montel et al. osservato un aumento dell'apoptosi nel centro dello sferoide ed un'invariata mitosi nella periferia, in sferoidi sottoposti a carico, abbiamo ipotizzato uno sforzo di compressione maggiore (in modulo) nel centro dello sferoide ed una minore presenza di cellule in questa zona.

Il modello scelto è di tipo poroelastico, con simmetria sferica, al quale sono state accoppiate due equazioni di crescita dello sferoide, una per la frazione volumetrica solida e l'altra per la variazione nel tempo della posizione del bordo, al fine di valutare l'evoluzione temporale del problema.

In assenza di informazioni sullo stato iniziale (in particolare sullo stato della frazione volumetrica solida $\varphi_s(r)$), le simulazioni iniziano con una variazione lineare nella coordinata radiale; tuttavia abbiamo osservato che i valori finali non variano significativamente in dipendenza del dato iniziale.

Le equazioni implementate sono state le seguenti:

$$\begin{aligned} & \bullet \quad r^2 \varphi_s (\lambda + 2\mu) \frac{\partial^2 u_r}{\partial r^2} + (\lambda + 2\mu) [\varphi'_s r^2 + 2\varphi_s r] \frac{\partial u_r}{\partial r} + [2\lambda r \varphi'_s - 2(\lambda + 2\mu) \varphi_s] u_r = \\ & 0; + c. b: \begin{cases} u_r(r = 0) = 0; \\ \varphi_s(r) T_{rr}(r = R) = -P_{dextran} \end{cases} \end{aligned}$$

- $\frac{d\varphi_s}{dt} = \gamma \cdot \varphi_s (trT - T^0)$
- $\frac{4\pi}{3} R^3(t) = \frac{\int_0^{2\pi} \int_0^\pi \int_0^{R(t)} r^2 \sin(\theta) \varphi_s(r,t) dr d\psi d\theta}{\varphi_0}$

dove abbiamo applicato l'importante ipotesi che la pressione osmotica dovuta al destrano imponga il carico solo sulla componente solida della miscela.

Attraverso l'applicazione del modello in forma numerica, tramite discretizzazione alle differenze finite, si sono ottenuti risultati qualitativamente in accordo con le osservazioni sperimentali.

In particolare, la frazione volumetrica solida (rappresentante la parte solida dello sferoide, ossia le cellule) cresce con la coordinata radiale ed è minima in corrispondenza del centro dello sferoide.

Tutte le componenti del tensore degli sforzi sono compressive e sono risultate massime in corrispondenza del centro dello sferoide, confermando l'ipotesi di maggiore compressione nella zona centrale.

Questo trend degli sforzi e della frazione volumetrica solida in funzione della coordinata radiale viene mantenuto per ogni istante temporale e per ogni carico esterno applicato non nullo.

Facendo evolvere temporalmente il sistema, si nota come gli sforzi aumentino (in modulo) e come, di conseguenza, la frazione volumetrica solida si riduca dove maggiore è la compressione. L'aspetto più rilevante dell'evoluzione temporale riguarda gli andamenti della crescita del diametro dello sferoide in funzione del tempo per diversi carichi imposti. Imponendo gli stessi carichi al bordo riportati da Montel et al. (0, 1, 2, 10 e 20 KPa [8]), le curve di crescita del volume dello sferoide nel tempo hanno presentato analogia con quelle sperimentali ed in particolare, si osserva una minore velocità di crescita nel caso in cui si aumenti (in modulo) il carico esterno imposto.

In conclusione, si può affermare che il modello proposto risulti adeguato alla descrizione della meccanica dello sferoide tumorale, in quanto riproduce qualitativamente i risultati sperimentali reperiti in letteratura.

Si ricorda però che il modello è stato applicato sotto la forte ipotesi che il carico esterno dovuto al destrano venga bilanciato interamente sulla parte solida dello sferoide, in quanto

si è supposto che la pressione del fluido all'interno ed all'esterno si bilancino. Questo aspetto andrebbe verificato sperimentalmente in vitro con misure di sforzo all'interno dello sferoide intatto, che risultano tecnicamente molto complesse.

Un aspetto insoddisfacente del modello è che non solo i carichi crescenti influenzano il tasso di crescita del diametro, ma addirittura non viene raggiunto nessuno stato stazionario a diametro costante: tutti gli sferoidi carichi asintoticamente si annichiscono.

Uno sviluppo successivo potrebbe essere innanzitutto una simulazione agli elementi finiti per mimare più fedelmente il comportamento dello sferoide in vitro; ed inoltre l'applicazione del modello qui implementato per lo svolgimento di esperimenti in vitro ed in vivo per tempi molto lunghi, al fine di verificare quando e se effettivamente la crescita dello sferoide tumorale giunga ad uno stato di regime e quali siano, in questo stato finale, le condizioni della frazione volumetrica solida e degli sforzi.

Appendice

Di seguito si riporta la funzione Matlab® implementata per il calcolo degli sforzi e dello spostamento in funzione della coordinata radiale.

```
function [u,Too,Trr,PHI,dPHI]= codice(R0, Rext, Nh, U0, phi_fun,
dphi_fun, P, lambda, mi)

k1=lambda+mi;
k2=lambda+(2*mi);
%calcolo del passo di campionamento
h=(Rext-R0)/Nh;

%costruzione del vettore R
R=linspace(R0,Rext,Nh)';

%inizializzazione del vettore U:
u=zeros(Nh,1);
u(1)=U0;

%costruzione dei vettore PHI e dPHI:
PHI=zeros(Nh,1);
dPHI=zeros(Nh,1);
phi=eval(phi_fun);
dphi=eval(dphi_fun);
PHI(1:Nh)=phi(1:Nh);
dPHI(1:Nh)=dphi(1:Nh);

%costruzione della matrice A:
A=zeros(Nh,Nh);
b=zeros(Nh,1);

for i=2:Nh-1
A(i,i)= -2*k2.*PHI(i).*( (R(i).^2)./(h^2) + 1 ) +
```

```

2*lambda.*dPHI(i).*R(i);
A(i,i+1)= k2.*PHI(i).*( (R(i).^2)./(h^2) + (R(i))./(h) ) + (
k2.*dPHI(i).*(R(i).^2)./(2*h) );%i+1
A(i,i-1)= k2.*PHI(i).*( (R(i).^2)./(h^2) - (R(i))./(h) ) - (
k2.*dPHI(i).*(R(i).^2)./(2*h) );%i-1
end

%correzioni su A:

A(1,1)=1; %riga 1
A(end,end-1)=-PHI(end).*k2/h; %riga Nh
A(end,end)= PHI(end).*((k2/h) + (2*lambda)./R(end));

%correzioni su b:
b(1)=U0;
b(2)= ( -PHI(2)/h^2 + (1/(2*h))*( 2*PHI(2)/R(2) + dPHI(2) ) ) *U0;
b(end)=-P;

%soluzione del sistema lineare:
u=A\b;

%sforzi:
A1=zeros(Nh-1,Nh-1);

for j=1:Nh-1

    A1(j,j)=-(k2/h) + (2*lambda)./R(j));
    A1(j,j+1)=k2/h;
end

Trr=zeros(Nh-1,1);
Trr(1:Nh-1)=A1*u;
Trr(Nh)=-P/PHI(Nh);

Too=zeros(Nh,1);
Too(2:Nh)=(lambda*(u(2:Nh)-u(1:Nh-1))/h) + 2*k1*(u(2:Nh)./R(2:Nh) );

```

```

end

%correzioni su A:
%riga Nh:
A(1,1)=1;
A(end,end-1)=-1;
A(end,end)= 1;

%correzioni su b:
b(1)=0;
b(2)= ( -PHI(2)/h^2 + (1/(2*h))*( 2*PHI(2)/R(2) + dPHI(2) ) ) *u(1);
b(end)=- (P*h)/(K*PHI(Nh));

%soluzione del sistema lineare:
u=A\b;

%calcolo degli sforzi:
Too=zeros(Nh,1);
Trr=zeros(Nh,1);

Trr(1:Nh-1)=K*(u(2:Nh)-u(1:Nh-1))/h;
Trr(Nh)=-P/(PHI(Nh));

Too(1:Nh)=K*( u(1:Nh) ./R(1:Nh) );

end

```

I comandi Matlab per il calcolo delle variabili e per la realizzazione dei grafici sono riportati di seguito.

```

clear all
close all
clc

R0=0;

```

```

Rext=0.45; % [mm] (450 micron)
Nh=200;

Pdex=1e-3; % [MPa] (1 KPa)
E=30e-3; % [MPa] (30 KPa)
poisson=0.45;
lambda=(poisson*E)/((1+poisson)*(1-2*poisson));
mi=E/(2*(1+poisson));

U0=0;

R=linspace(R0,Rext,Nh);

phi_fun=' .29 + .2*R '; %phi lineare
dphi_fun=' .2*(R.^0) ';

%% RICHIAMO FUNZIONI
[u,Too,Trr,PHI]=codice(R0, Rext, Nh, U0, phi_fun, dphi_fun, Pdex, lambda,
mi);
[u1,Too1,Trr1,PHI1]=codice_cost(R0, Rext, Nh, U0, Pdex, lambda, mi);

%% PLOT SPOSTAMENTO

plot(R,u,'b','linewidth',2)
xlabel('r [mm]')
ylabel('u(r) [mm]')
title('SPOSTAMENTO')

%hold on
%plot(R,u1,'r','linewidth',2)
%legend('u(r) per phi=0.2*r+0.29', 'u(r) per phi=0.47')

%% PLOT Too
figure
plot(R(2:end), Too(2:end), 'm', 'linewidth',2)
xlabel('r [mm]')
ylabel('Tc(r) [MPa]')

```



```

title('SFORZO CIRCONFERENZIALE')

%hold on
%plot(R(2:end), Tool(2:end), 'r','linewidth',2)
%legend('Tc(r) per phi=0.2*r+0.29', 'Tc(r) per phi=0.38')

%% PLOT Trr
figure
plot(R(2:end), Trr(2:end),'g','linewidth',2)
xlabel('r [mm]')
ylabel('Tr(r) [MPa]')
title('SFORZO RADIALE')

%hold on
%plot(R(2:end),Trr1(2:end),'r','linewidth',2)
%legend('Tr(r) per phi=0.2*r+0.29', 'Tr(r) per phi=0.47')

%% PLOT phi
figure
plot(R, PHI,'k',R, PHI1,'r','linewidth',2);
xlabel('r [mm]')
ylabel('PHI(r)')
legend('Phi lineare','Phi costante')

```

L'implementazione della funzione con l'aggiunta dell'evoluzione temporale viene riportata di seguito.

```

function [u_RT,PHI_RT,Too_RT,Trr_RT,R_T,R_RT]= codTime3(R0, Rext, Nh, U0,
phi_fun, dphi_fun, P, lambda, mi, tf, Nt, T0)

gamma=1; %giorni
h=(Rext-R0)/Nh;
dt=tf/Nt; %considero t0=0

k1=lambda+mi;

```

```

k2=lambda+(2*mi);

R=linspace(R0,Rext,Nh)';
t=linspace(0,tf,dt)';

u=zeros(Nh,1);

Too=zeros(Nh,1);
Trr=zeros(Nh,1);
trT=zeros(Nh,1);

PHI=zeros(Nh,1);
dPHI=zeros(Nh,1);

phi=eval(phi_fun);
dphi=eval(dphi_fun);
PHI(1:Nh)=phi(1:Nh);
dPHI(1:Nh)=dphi(1:Nh);

%inizializzazione in tempo:
PHI_RT=[]; %sarà una matrice NhxNt
Too_RT=[];
Trr_RT=[];
u_RT=[];
R_RT=[];
R_T=[];
trT_RT=[];

for j=1:Nt
%costruisco la matrice A:
A=zeros(Nh,Nh);
b=zeros(Nh,1);

for i=2:Nh-1
A(i,i)= -2*k2.*PHI(i).*( (R(i).^2)./(h^2) + 1 ) +
2*lambda.*dPHI(i).*R(i);
A(i,i+1)= k2.*PHI(i).*( (R(i).^2)./(h^2) + (R(i))./(h) ) + (
k2.*dPHI(i).*(R(i).^2)./(2*h) );%i+1
A(i,i-1)= k2.*PHI(i).*( (R(i).^2)./(h^2) - (R(i))./(h) ) - (

```

```

k2.*dPHI(i).*(R(i).^2)./(2*h) );%i-1
end

%correzioni su A:
%riga Nh:

A(1,1)=1;
A(end,end-1)=-k2/h;
A(end,end)=(k2/h) + (2*lambda)./R(end);

%correzioni su b:
b(1)=U0;
b(2)= ( -PHI(2)/h^2 + (1/(2*h))*( 2*PHI(2)/R(2) + dPHI(2) ) ) *U0;
b(end)=-P/PHI(end);

%soluzione del sistema lineare:
u=A\b;

%calcolo degli sforzi:
Trr(1:Nh-1)=k2*(u(2:Nh)-u(1:Nh-1))./h + 2*lambda*u(1:Nh-1)./R(1:Nh-1);
Trr(Nh)=-P/(PHI(Nh));

Too(2:Nh)=(lambda*(u(2:Nh)-u(1:Nh-1))/h) + 2*k1*(u(2:Nh)./R(2:Nh) );
trT(2:Nh)= Trr(2:Nh) + (2.*Too(2:Nh));

%EVOLUZIONE TEMPORALE
PHI(2:Nh)=PHI(2:Nh)./(1 - (dt*gamma*(trT(2:Nh)-T0))); %eulero indietro

R(end)=(3*(sum((R.^2).*PHI*h))/(.29)).^(1/3);
h=(R(end)-R0)/Nh;
R=linspace(R0,R(end),Nh)';

R_T=[R_T; R(end)]; %vettore che raccoglie i raggi finali ad ogni istante
temporale
R_RT=[R_RT R(2:end)]; %vettore che raccoglie tutti i raggi ad ogni
istante temporale

PHI_RT=[PHI_RT PHI(2:end)];

```

```
Too_RT=[Too_RT Too(2:end)];  
Trr_RT=[Trr_RT Trr(2:end)];  
u_RT=[u_RT u(2:end)];  
trT_RT=[trT_RT trT(2:Nh)];
```

```
end
```

```
end
```

I comandi per il richiamo delle funzioni e la stampa dei grafici sono i seguenti:

```
%% DATI INIZIALI  
  
clear all  
close all  
clc  
  
R_0=0;  
Rext=0.45; %mm diametro=900 micron  
Nh=20;  
  
tf=14;  
Nt=15;  
  
Too0=-5*1e-3; %MPa  
  
Pdex1=1e-3; %MPa (1 KPa)  
Pdex2=2*1e-3;  
Pdex0=0;  
Pdex3=10*1e-3;  
Pdex4=20*1e-3;  
  
E=30*1e-3;%Pa (30 KPa)  
poisson=0.45;
```

```
lambda=(poisson*E)/((1+poisson)*(1-2*poisson));
mi=E/(2*(1+poisson));
```

```
U0=0;
```

```
t=linspace(0,tf,Nt);
R=linspace(R_0,Rext,Nh);
```

Caso omogeneo:

```
%% CASO PHI=costante
% stringhe
```

```
phi0=.47;
phi_fun1=' .47*R.^0';
dphi_fun1= ' 0.*R ';
[u_RT,PHI_RT,Too_RT,Trr_RT,R_RTK,R_K]=codTime3(R_0, Rext, Nh, U0,
phi_fun1, dphi_fun1, Pdex1, lambda, mi, tf, Nt, Too0)
[u_RTK0,PHI_RTK0,Too_RTK0,Trr_RTK0,R_RTK0,R_K0]=codTime3(R_0, Rext, Nh,
U0, phi_fun1, dphi_fun1, Pdex0, lambda, mi, tf, Nt, Too0)
[u_RTK2,PHI_RTK2,Too_RTK2,Trr_RTK2,R_RTK2,R_K2]=codTime3(R_0, Rext, Nh,
U0, phi_fun1, dphi_fun1, Pdex2, lambda, mi, tf, Nt, Too0)
[u_RTK3,PHI_RTK3,Too_RTK3,Trr_RTK3,R_RTK3,R_K3]=codTime3(R_0, Rext, Nh,
U0, phi_fun1, dphi_fun1, Pdex3, lambda, mi, tf, Nt, Too0)
[u_RTK4,PHI_RTK4,Too_RTK4,Trr_RTK4,R_RTK4,R_K4]=codTime3(R_0, Rext, Nh,
U0, phi_fun1, dphi_fun1, Pdex4, lambda, mi, tf, Nt, Too0)
```

```
%% GRAFICI PHI COSTANTE:
```

```
figure
plot(t,PHI_RT,'linewidth',1)
title('PHI in funzione di t')
xlabel('t [giorni]')
ylabel('PHI')
figure
plot(R_K,PHI_RT,'linewidth',1)
title('PHI in funzione di R')
```

```

xlabel('r [mm]')
ylabel('PHI')

%SFORZI:
figure
plot(t,Too_RT,'linewidth',1)
title('Too in funzione di t')
xlabel('t [giorni]')
ylabel('Too [MPa]')
figure
plot(R_K,Too_RT,'linewidth',1)
title('Too in funzione di R')
xlabel('r [mm]')
ylabel('Too [MPa]')

figure
plot(t,Trr_RT,'linewidth',1)
title('Trr in funzione di t')
xlabel('t [giorni]')
ylabel('Trr [MPa]')
figure
plot(R_K,Trr_RT,'linewidth',1)
title('Trr in funzione di R')
xlabel('r [mm]')
ylabel('Trr [MPa]')

figure
plot(t,u_RT,'linewidth',1)
title('u in funzione di t')
xlabel('t [giorni]')
ylabel('u [mm]')
figure
plot(R_K,u_RT,'linewidth',1)
title('u in funzione di R')
xlabel('r [mm]')
ylabel('u [mm]')

```

Caso non omogeneo:

```
%% CASO PHI=lineare
% stringhe

phi_fun='.29 + .2*R';
dphi_fun= '.2*(R.^0)';
%[u_RT,PHI_RT,Too_RT,Trr_RT]=codTime(R0, Rext, Nh, U0, phi_fun, dphi_fun,
Pdex, K, tf, Nt, Too0, Trr0)

%per calcolare anche il volume:
[u_RT1,PHI_RT1,Too_RT1,Trr_RT1,R_RT1,R1]=codTime3(R_0, Rext, Nh, U0,
phi_fun, dphi_fun, Pdex1, lambda, mi, tf, Nt, Too0);
[u_RT2,PHI_RT2,Too_RT2,Trr_RT2,R_RT2,R2]=codTime3(R_0, Rext, Nh, U0,
phi_fun, dphi_fun, Pdex2, lambda, mi, tf, Nt, Too0);
[u_RT0,PHI_RT0,Too_RT0,Trr_RT0,R_RT0,R0]=codTime3(R_0, Rext, Nh, U0,
phi_fun, dphi_fun, Pdex0, lambda, mi, tf, Nt, Too0);
[u_RT3,PHI_RT3,Too_RT3,Trr_RT3,R_RT3,R3]=codTime3(R_0, Rext, Nh, U0,
phi_fun, dphi_fun, Pdex3, lambda, mi, tf, Nt, Too0);
[u_RT4,PHI_RT4,Too_RT4,Trr_RT4,R_RT4,R4]=codTime3(R_0, Rext, Nh, U0,
phi_fun, dphi_fun, Pdex4, lambda, mi, tf, Nt, Too0);

%% VOLUME IN FUNZIONE DEL TEMPO

R3_1=(R_RT1./Rext).^3; %volume normalizzato rispetto a quello iniziale
R3_2=(R_RT2./Rext).^3;
R3_3=(R_RT3./Rext).^3;
R3_4=(R_RT4./Rext).^3;
R3_0=(R_RT0./Rext).^3;

figure
plot(t,R3_0,'b','linewidth',2)
hold on
plot(t,R3_1,'r','linewidth',2)
hold on
plot(t,R3_2,'g','linewidth',2)
hold on
plot(t,R3_3,'k','linewidth',2)
hold on
```

```

plot(t,R3_4,'m','linewidth',2)
legend('P=0','P=1 KPa','P=2 KPa','P=10 KPa','P=20 KPa')
%legend('P=1 KPa','P=2 KPa','P=10 KPa','P=20 KPa')
%legend('P=0','P=1 KPa','P=2 KPa')
xlabel('t [giorni]')
ylabel('Volume normalizzato')
title('Andamento Volume in funzione del tempo')

```

```

%% Raggi

```

```

figure
plot(t,R_RT1,'linewidth',2);
xlabel('t [giorni]');
ylabel('Rext(t) [mm]')
figure
plot(t,R_RT0,'r','linewidth',2);
xlabel('t [giorni]');
ylabel('Rext(t) [mm]')
figure
plot(t,R_RT3,'g','linewidth',2);
xlabel('t [giorni]');
ylabel('Rext(t) [mm]')

```

```

figure
plot(t,R_RT0,'r','linewidth',2);
hold on
plot(t,R_RT1,'linewidth',2);
hold on
plot(t,R_RT3,'m','linewidth',2);
legend('P=0 KPa','P= 1 KPa','P=10 KPa')
xlabel('t [giorni]');
ylabel('Rext(t) [mm]')

```

```

%% GRAFICI PHI

```

```

figure
plot(t,PHI_RT3,'linewidth',1)
title('PHI(r,t) in funzione di t')
xlabel('t [giorni]')

```



```
ylabel('PHI')
```

```
figure  
plot(R3,PHI_RT3,'linewidth',1);  
title('PHI(r,t) in funzione di r')  
xlabel('r [mm]')  
ylabel('PHI(r,t)')
```

```
figure  
mesh(t,R3,PHI_RT3)
```

```
figure  
plot(t,PHI_RT3(1,:), 'linewidth',1.5)  
hold on  
plot(t,PHI_RT3(end,:), 'r', 'linewidth',1.5)  
title('PHI in funzione di t')  
xlabel('t [giorni]')  
ylabel('PHI(r,t)')  
legend('PHI (r=R0)', 'PHI (r=Rext)')
```

```
figure  
plot(R3(:,1),PHI_RT3(:,1), 'g', 'linewidth',2)  
hold on  
plot(R3(:,end),PHI_RT3(:,end), 'm', 'linewidth',2)  
title('PHI in funzione di r')  
xlabel('r [mm]')  
ylabel('PHI(r,t)')  
legend('PHI (t=0)', 'PHI (t=tf)')
```

```
%% GRAFICI Too
```

```
figure  
plot(t,Too_RT3,'linewidth',1)  
title('Tc in funzione di t')  
xlabel('t [giorni]')  
ylabel('Tc(r,t)')
```

```
figure
```

```

plot(R3,Too_RT3,'linewidth',1)
title('Tc in funzione di r')
xlabel('r [mm]')
ylabel('Tc(r,t)')

```

```

figure
mesh(t,R3,Too_RT3)

```

```

figure
plot(t,Too_RT3(1,:), 'linewidth',2)
hold on
plot(t,Too_RT3(end,:), 'r', 'linewidth',2)
title('Tc(r,t) in funzione di t')
xlabel('t [giorni]')
ylabel('Tc(r,t)[MPa]')
legend('Tc (r=R0)', 'Tc (r=Rext)')

```

```

figure
plot(R3(:,1),Too_RT3(:,1), 'g', 'linewidth',2)
hold on
plot(R3(:,end),Too_RT3(:,end), 'm', 'linewidth',2)
title('Tc(r,t) in funzione di r')
xlabel('r [mm]')
ylabel('Tc(r,t) [MPa]')
legend('Tc (t=0)', 'Tc (t=tf)')

```

```

%% GRAFICI Trr

```

```

figure
plot(t,Trr_RT3,'linewidth',1)
title('Tr in funzione di t')
xlabel('t [giorni]')
ylabel('Tr(r,t) [MPa]')
figure
plot(R3,Trr_RT3,'linewidth',1)
title('Tr(r,t) in funzione di r')
xlabel('r [mm]')
ylabel('Tr(r,t) [MPa]')

```

```

figure
mesh(t,R3,Trr_RT3,'linewidth',2)

figure
plot(t,Trr_RT3(2,:), 'linewidth',2)
hold on
plot(t,Trr_RT3(end,:), 'r', 'linewidth',2)
title('Tr(r,t) in funzione di t')
xlabel('t [giorni]')
ylabel('Tr [MPa]')
legend('Tr (r=R0)', 'Tr (r=Rext)')

figure
plot(R3(:,1),Trr_RT3(:,1), 'g', 'linewidth',2)
hold on
plot(R3(:,end),Trr_RT3(:,end), 'm', 'linewidth',2)
title('Tr(r,t) in funzione di r')
xlabel('r [mm]')
ylabel('Tr(r,t) [MPa]')
legend('Tr (t=0)', 'Tr (t=tf)')

%% GRAFICI U
figure
plot(t,u_RT3,'linewidth',1)
title('u in funzione di t')
xlabel('t [giorni]')
ylabel('u(r,t) [mm]')

figure
plot(R3,u_RT3,'linewidth',1)
title('u(r,t) in funzione di r')
xlabel('r [mm]')
ylabel('u [mm]')

figure
mesh(t,R3,u_RT3,'linewidth',2)

```

Bibliografia

- [1] F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, and L. A. Kunz-Schughart, *Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again*; J. Biotechnol. 148, 3 (2010).
- [2] Friedrich, J., Ebner, R., Kunz-Schughart, L.A., 2007; *Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge?*; Int. J. Radiat. Biol. 83, 849–871.
- [3] Ingram, M., Techy, G.B., Saroufeem, R., Yazan, O., Narayan, K.S., Goodwin, T.J., Spaulding, G.F., 1997. *Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor*; In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 33, 459–466.
- [4] Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., Kunz-Schughart, L.A., 2009. *Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach*; Nature Protoc. 4, 309–324.
- [5] Ivascu, A., Kubbies, M., 2006. *Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis*; J. Biomol. Screen. 11, 922–932.
- [6] H.P. Greenspan; J. Folkman; *Influence of geometry on control of cell growth*; Biochim Biophys Acta. 1975 Dec 31; 417(3-4): 211-36;
- [7] J. Folkman; *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*; N Engl J Med. 1971 Nov 18; 285(21):1182-6;
- [8] Montel F, Delarue M, Elgeti J, Malaquin L, Basan M, Risler T, Cabane B, Vignjevic D, Prost J, Cappello G, Joanny JF; *Stress clamp experiments on multicellular tumor spheroids*; Physical Review Letters 107,188102, 2011 October.
- [9] Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK.; *Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids*; Nat Biotechnol. 1997 August;15(8): 778-83.
- [10] T. Stylianopoulos, J.D. Martin, V.P. Chauhan, S.R. Jain, B. Diop-Frimpong, N.Bardeesy, B.L. Smith, C.R. Ferrone, F.J. Hornicek, Y.Boucher, L.L. Munn, R.K. Jain; *Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors*; PNAS; September 18, 2012, vol. 109, no. 38, 15101–15108;

- [11] D. Ambrosi; G. Mollica, *On the mechanics of growing tumor*; International Journal of Engineering Science 40 (2002) 1297–1316;
- [12] Roose T, Netti PA, Munn LL, Boucher Y, Jain RK; *Solid stress generated by spheroid growth estimated using a linear poroelasticity model*; Microvasc Res. 2003 Nov; 66(3):204-12;
- [13] K.J. Cowan, *Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress*; *J. Exp. Biol.* 2003, **206** 1107–15
- [14] Delarue M, Montel F, Caen O, Elgeti J, Siaugue JM, Vignjevic D, Prost J, Joanny JF, Cappello G; *Mechanical control of cell flow in multicellular spheroids*; Physical Review Letters 110,138103, 2013 March.
- [15] M. J. Dorie, R. F. Kallman, D. P. Rapacchietta, D. V. Antwerp, and Y.R. Huang, *Effect of cytochalasin B, nocodazole and irradiation on migration and internalization of cells and microspheres in tumor cell spheroids* 141, 201; 1982.
- [16] M. Grasselli; *Appunti del corso di metodi matematici e numerici per l'ingegneria*; Politecnico di Milano, Dipartimento di Ingegneria Industriale e dell'Informazione, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, a.a. 2013-2014;
- [17] G. Dubini; *Dispense del corso di Biofluidodinamica*; Politecnico di Milano, Dipartimento di Ingegneria Industriale e dell'Informazione, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, a.a. 2013-2014;
- [18] G. Petrucci; *Lezioni di Costruzione di Macchine*; Cap.3, Teoria dell'elasticità, 3.1-3.10;
- [19] Y.R. Talpaert; *Tensor analysis and continuum mechanics*; Kluwer Academic Publisher, The Netherlands 2002;
- [20] G. Dubini; *Appunti del corso di fenomeni di trasporto nei sistemi biologici*; Politecnico di Milano, Dipartimento di Ingegneria Industriale e dell'Informazione, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, a.a. 2014-2015; Rev. 2015; Parte 2 Trasporto di Materia, pp. 13:19.
- [21] A. Quarteroni; *Modellistica Numerica per Problemi Differenziali*; Ed. Springer, 2012;
- [22] J. Facciorusso, C. Madiati, G. Vannucchi; *Dispense di Geotecnica*; Dipartimento di

Ingegneria Civile – Sezione Geotecnica, Università degli Studi di Firenze, Rev. 2006. Cap.3, pp. 29:32.

[23] G. Dubini; *Appunti del corso di fenomeni di trasporto nei sistemi biologici*; Politecnico di Milano, Dipartimento di Ingegneria Industriale e dell'Informazione, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, a.a. 2014-2015; Rev. 2015; Parte 3 Trasporto di Materia, pp. 3:8.

[24] D. Ambrosi, G. A. Ateshian, E. M. Arruda, S. C. Cowin, J. Dumais, A. Goriely, G. A. Holzapfel, J. D. Humphrey, R. Kemkemer, E. Kuhl, J. E. Olberding, L. A. Taber, and K. Garikipati; *Perspectives on biological growth and remodeling*; J Mech Phys Solids. 2011 April 1; 59(4): 863–883.