



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL
FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

SVILUPPO FORMULATIVO DI UN SISTEMA BISTRATO
MULTIFUNZIONALE PER PROMUOVERE LA RIGENERAZIONE
TISSUTALE E PREVENIRE LE ADERENZE POST-OPERATORIE

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Sandri Giuseppina

Dr. Ruggeri Marco

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

Martina Ferrari

Matricola: 502404

Anno Accademico 2025/2026

I. INTRODUZIONE.....	1
1. Le aderenze post-operatorie e il tessuto peritoneale	1
1.1 Definizione di aderenze post-operatorie	1
1.2 Eziopatogenesi delle aderenze addominali	2
1.3 Complicanze associate alle aderenze post-operatori	3
1.4 Anatomia e fisiologia del peritoneo.....	5
1.4.1 Organizzazione microscopica	6
1.4.2 Dinamismo biologico del tessuto peritoneale	7
1.4.3 Differenze anatomiche	8
2. Fisiopatologia e modelli di formazione delle aderenze.....	8
2.1 Evoluzione dei modelli di formazione delle aderenze post-operatorie.....	8
2.1.1 Modello fibroblastico classico	9
2.1.2 Modello della transizione mesotelio-mesenchimale (MMT).....	10
2.1.3 Modello dell'attivazione mesoteliale.....	11
2.2 Patogenesi delle aderenze post-operatorie	12
2.2.1 Evoluzione temporale della formazione delle aderenze.....	12
2.2.2 Meccanismi fisiopatologici della formazione delle aderenze	14
2.2.2.1 Inibizione dei sistemi di fibrinolisi.....	14
2.2.2.2 Risposta immunitaria e infiammatoria	16
2.2.2.3 Ipossia tissutale e angiogenesi.....	17
2.3 Cellule e pathways coinvolti.....	18
2.3.1 Cellule mesoteliali.....	19
2.3.2 Fibroblasti e miofibroblasti	20
2.3.3 Macrofagi	21
2.3.4 Neutrofili	22
2.3.5 Linfociti T	23
2.3.6 Mastociti.....	24
3. Strategie preventive.....	25
3.1 Ottimizzazione della tecnica chirurgica.....	25

3.2 Approccio farmacologico	26
3.3 Barriere fisiche.....	28
3.3.1 Requisiti di una barriera fisica ideale.....	28
3.3.2 Meccanismi d'azione	29
3.4 Dispositivi e prodotti commerciali	31
3.4.1 Soluzioni liquide	31
3.4.2 Film e membrane solide	32
3.4.3 Idrogeli e spray.....	32
3.5 Evoluzione delle barriere: scaffold multifunzionali ed avanzati	33
3.5.1 Electrospinning	33
3.5.2 Solvent casting	34
3.5.3 Sistemi bilayer.....	35
3.5.4 Caricamento farmacologico localizzato	36
4. Biomateriali.....	37
4.1 PLGA	38
4.2 Destrano	39
4.3 Chitosano	40
4.4 Condroitin solfato	41
4.5 Acido ialuronico	42
II. SCOPO.....	44
III. PARTE SPERIMENTALE.....	47
1. Materiali.....	47
2. Metodi.....	48
2.1 Preparazione delle fibre elettrofilate.....	48
2.1.1. Allestimento della soluzione polimerica	48
2.1.2 Analisi reologica	48
2.1.3 Electrospinning	50
2.1.4 Crosslinking	51

2.2 Preparazione dei film polimerici.....	51
2.2.1 Allestimento delle soluzioni polimeriche	51
2.2.2 Processo di solvent casting	52
2.3 Test di degradazione	52
2.4 Sistema bistrato.....	53
2.4.1 Metodologia di assemblaggio del sistema composito.....	53
2.5 Caratterizzazione	53
2.5.1 SEM	53
2.5.2 Analisi dimensionale.....	54
2.5.3 AFM	54
2.5.4 FT-IR.....	55
2.6 Proprietà meccaniche.....	56
2.6.1 Prove di trazione	56
2.6.2 DMA	57
2.7 Studio di bioadesione.....	58
2.8 Studi di rilascio in vitro	59
2.9 Test in vitro su fibroblasti.....	61
2.9.1 Coltura di fibroblasti del derma umano	61
2.9.2 Tripsinizzazione e conta delle cellule	61
2.9.3 Test di proliferazione cellulare	62
2.9.4 Morfologia cellulare.....	62
IV. DISCUSSIONE E RISULTATI.....	64
1. Sviluppo e caratterizzazione delle fibre elettrofilate.....	64
1.1 Studio preformativo	64
1.2 Caratterizzazione reologica delle soluzioni polimeriche	66
1.3 Sviluppo formulativo delle fibre elettrofilate	67
1.4 Swelling index	69
1.5 Caratterizzazione chimico-fisica.....	71
1.6 Caratterizzazione meccanica.....	72

2. Sviluppo e caratterizzazione dei film polimerici.....	75
2.1 Studio preformativo e valutazione delle proprietà meccaniche.....	75
2.2 Caratterizzazione morfologica e topografica.....	77
3. Valutazione della degradazione in vitro	79
4. Assemblaggio e caratterizzazione del sistema bistrato	80
4.1 Valutazione morfologica	80
4.2 Valutazione della bioadesione	81
4.3 Studi di rilascio in vitro	82
4.4 Analisi dinamico meccanica	83
4.5 Valutazione preliminare di adesione e proliferazione cellulare.....	85
<i>V. CONCLUSIONI.....</i>	88
<i>VI. BIBLIOGRAFIA</i>	90
<i>VII. SITOGRAFIA.....</i>	97

I. INTRODUZIONE

1. Le aderenze post-operatorie e il tessuto peritoneale

1.1 Definizione di aderenze post-operatorie

Le aderenze post-operatorie sono connessioni patologiche, di natura congenita o post-operatoria, che si sviluppano tra superfici anatomiche normalmente separate all'interno di una cavità corporea [1]. Esse possono presentarsi morfologicamente come sottili filamenti di tessuto connettivo oppure come spessi ponti fibrosi caratterizzati dalla presenza di vasi sanguigni e tessuto nervoso [2], [3].

L'attuale comprensione delle aderenze evidenzia la loro natura dinamica e rigenerativa, caratterizzata da specifici processi cellulari e molecolari che si attivano in risposta a un danno tissutale [1], [2], [3].

In seguito a un intervento chirurgico, i tessuti traumatizzati vanno incontro a un processo di riparazione che prevede la deposizione iniziale di fibrina tra le superfici lesionate. Tale deposito, se non adeguatamente rimosso attraverso i normali meccanismi fibrinolitici, può fungere da impalcatura per la progressiva organizzazione di un tessuto cicatriziale anomalo [3], [4]. Questo processo dinamico porta, infine, alla formazione di connessioni fibrose permanenti tra superfici peritoneali che, in condizioni fisiologiche, risultano libere e indipendenti (*Figura 1*) [1].

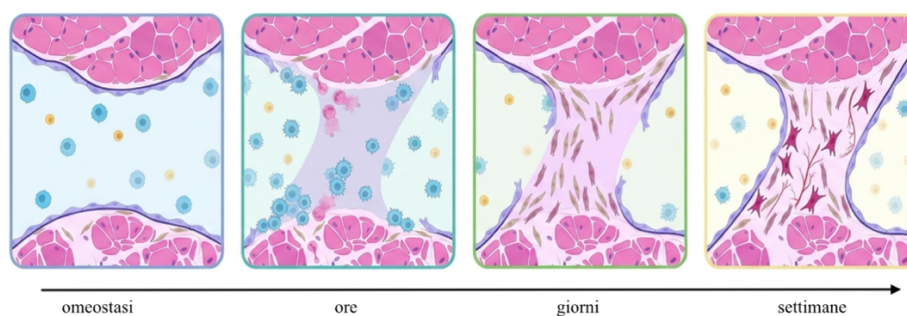


Figura 1: Rappresentazione schematica dell'evoluzione temporale e biologica nella formazione delle aderenze post-operatorie.

1.2 Eziopatogenesi delle aderenze addominali

Le cause eziologiche delle aderenze possono essere generalmente suddivise nelle seguenti categorie:

- **Origine post-chirurgica**

Le aderenze di origine post-chirurgica rappresentano la quota più rilevante, costituendo circa il 90% delle aderenze addominali [5], [6]. Esse insorgono in seguito a traumi peritoneali durante interventi chirurgici, in particolare laparotomia, ovvero chirurgia a cielo aperto e, in misura minore, laparoscopia, ovvero chirurgia mini-invasiva [6].

L'incidenza delle aderenze dopo chirurgia laparoscopica è sensibilmente inferiore rispetto alla laparotomia: si stima che le aderenze si sviluppino nel 93-100% dei casi dopo laparotomie addominali superiori, mentre l'approccio laparoscopico ridurrebbe questo rischio a circa il 45-51% [6]. La laparotomia, essendo una procedura a cielo aperto che richiede un'incisione addominale, comporta una maggiore esposizione dei tessuti e un incremento del trauma peritoneale, determinando così una maggiore risposta infiammatoria e un conseguente aumento del rischio di formazione di aderenze [6]. Al contrario, la laparoscopia, grazie a incisioni di dimensioni ridotte, consente una minore manipolazione tissutale e un più rapido recupero dei tessuti. Tuttavia, nonostante questi vantaggi, la laparoscopia, pur riducendo la formazione di aderenze, non elimina completamente il rischio di complicanze cliniche correlate [5], [6].

Un ulteriore fattore di rischio significativo è rappresentato da precedenti interventi chirurgici, poiché la ripetizione di procedure aumenta la probabilità di danno tissutale cumulativo [5].

- **Origine non chirurgica**

Le aderenze possono formarsi anche in assenza di chirurgia a causa di processi infiammatori o infettivi che interrompono la superficie mesoteliale. In particolare, l'endometriosi rappresenta una delle cause più frequenti di aderenze pelviche nelle

donne. Ulteriori patologie sono la diverticolite, il morbo di Crohn e la tubercolosi addominale, che possono determinare processi infiammatori cronici capaci di favorire la formazione di aderenze anche in assenza di interventi chirurgici. Infatti queste condizioni innescano segnali infiammatori e processi di coagulazione della fibrina che portano alla formazione di bande fibrose tra gli organi [5].

- A seguito di radioterapia addominopelvica

Le procedure di radioterapia addominopelvica, utilizzate nel trattamento di diverse neoplasie ginecologiche, prostatiche, rettali o linfoproliferative, possono indurre la formazione di aderenze come effetto tardivo. La gravità di tali aderenze dipende dall'estensione anatomica dell'area trattata, dal grado di frazionamento della dose e dall'intensità della risposta tissutale. Questo tipo di aderenze sono spesso dense e difficili da gestire a causa della natura compromessa dei tessuti sottostanti, che risultano cronicamente ischemici o friabili [5].

1.3 Complicanze associate alle aderenze post-operatori

La formazione di aderenze può avere conseguenze rilevanti sugli esiti clinici e sulla qualità di vita dei pazienti [7], [8]. Tali alterazioni possono infatti essere associate a un ampio spettro di complicanze, che spaziano da condizioni croniche e debilitanti, come il dolore addominale persistente, fino a situazioni potenzialmente letali quali l'occlusione intestinale [6], [7], [8]. Inoltre, le aderenze possono determinare importanti ripercussioni funzionali, tra cui infertilità e paralisi, influenzando profondamente la vita dei pazienti [6], [9]. Le complicanze associate alle aderenze possono essere distinte in complicanze dirette, derivanti dalla presenza stessa del tessuto aderenziale, e complicanze indirette, correlate principalmente alle difficoltà incontrate durante eventuali procedure chirurgiche successive [6].

Complicanze dirette

Tra le principali complicanze dirette rientra l'occlusione del piccolo intestino (SBO), di cui le aderenze sono la causa principale nel 65–75% dei casi [6]. Il

rischio di insorgenza aumenta con il numero di interventi chirurgici addominali pregressi, che favoriscono la formazione di aderenze peritoneali progressivamente più complesse [6], [8].

Le recidive dopo trattamento chirurgico per occlusione intestinale acuta sono frequenti e interessano il 12–19% dei pazienti [3]. I principali fattori di rischio comprendono un'età inferiore ai 40 anni, un decorso post-operatorio complicato, la tipologia delle aderenze, la presenza di oltre tre interventi addominali pregressi e il precedente trattamento conservativo di un'occlusione [3], [6]. È stato inoltre osservato che l'aumento del numero di procedure chirurgiche non si associa necessariamente a un incremento proporzionale del rischio di occlusione intestinale, suggerendo che la complessità biologica e strutturale delle aderenze svolga un ruolo determinante nello sviluppo della complicità [6].

Un'ulteriore manifestazione clinica è rappresentata dal dolore addominale cronico associato alle aderenze [8]. Si tratta di una condizione ancora controversa, la cui definizione non è univoca e risulta spesso poco standardizzata nei diversi studi, rendendo difficile stabilirne la reale incidenza. È stato inoltre osservato che tale sintomatologia tende frequentemente a recidivare anche dopo un iniziale miglioramento clinico [6], [10]. Dal punto di vista psicologico, la recidiva dell'occlusione e la cronicizzazione della sintomatologia possono determinare un rilevante carico emotivo, con ansia anticipatoria, timore di nuovi episodi e riduzione della qualità di vita [10].

Complicanze indirette

Le complicanze indirette delle aderenze post-operatorie si manifestano prevalentemente in occasione di successivi re-interventi chirurgici [8], [9]. La presenza di tessuto aderenziale altera la normale anatomia, aumentando significativamente la complessità tecnica delle procedure e determinando un prolungamento dei tempi operatori, specialmente quando il sito chirurgico è già stato precedentemente dissezionato [9].

Le aderenze sono inoltre associate a una maggiore morbidità intraoperatoria, principalmente a causa del rischio di lesioni intestinali. Tali lesioni si verificano con una frequenza compresa tra lo 0,06% e il 19% dei casi e possono determinare importanti complicanze post-operatorie, tra cui fistole, occlusione intestinale, ascessi della ferita e complicanze respiratorie [10].

1.4 Anatomia e fisiologia del peritoneo

Il peritoneo costituisce il rivestimento sieroso della cavità addominale, rappresentando la più estesa delle tre cavità sierose del corpo umano. La sua superficie totale nell'adulto è di circa 1,8 m², una dimensione paragonabile a quella cutanea. Anatomicamente, esso è organizzato in due foglietti continui tra loro (*Figura 2*) [11], [12]:

- *Peritoneo viscerale*: riveste direttamente gli organi intra-addominali (come fegato, milza, stomaco, intestino e organi riproduttivi femminili), integrandone lo strato sieroso esterno [11];
- *Peritoneo parietale*: ricopre la superficie interna delle pareti addominali e pelviche. Questa porzione presenta una particolare abbondanza di fibre elastiche negli strati profondi e una densità relativamente bassa di cellule del tessuto connettivo [11].

Tra questi due foglietti si delimita la cavità peritoneale, uno spazio viscerale che permette agli organi di muoversi liberamente con un attrito minimo grazie alla presenza di fluido peritoneale. In condizioni fisiologiche, la cavità contiene tra i 5 e i 100 ml di questo ultrafiltrato plasmatico, che funge da lubrificante ed è essenziale per il mantenimento dell'omeostasi addominale [13].

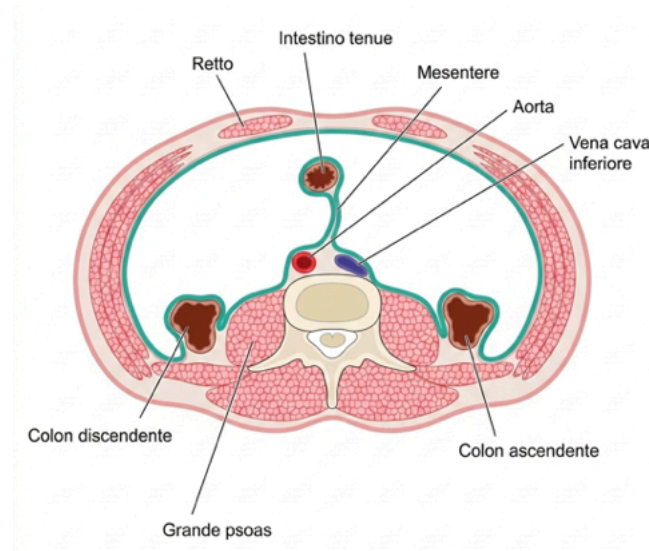


Figura 2: Sezione trasversale della cavità addominale e organizzazione anatomica del peritoneo. Lo schema evidenzia la continuità istologica tra il peritoneo parietale (linea verde adesiva alla parete addominale interna) e il peritoneo viscerale (linea verde scura in riflessione sui visceri) (immagine creata con Biorender).

1.4.1 Organizzazione microscopica

Dal punto di vista istologico, il peritoneo non è una semplice membrana passiva, ma una struttura complessa composta da tre strati (*Figura 3*) [11], [12]:

1. *Mesotelio*: un monolayer di cellule mesoteliali piatte o cuboidali caratterizzate, sulla superficie apicale, da numerosi microvilli e ciglia. Questa organizzazione protegge la superficie dai danni da attrito, sequestra microrganismi e facilita il trasporto di sostanze [12], [13];
2. *Lamina Basale*: un sottile strato di matrice extracellulare (composta da collagene di tipo IV e laminina) che supporta il mesotelio [13];
3. *Stroma Sottomesoteliale*: un tessuto connettivo riccamente vascolarizzato e drenato da vasi linfatici, contenente fibroblasti, adipociti, mastociti e macrofagi [13].

All'interno di questa struttura si trovano formazioni specializzate come i *milky spots*, aggregati linfoidi situati principalmente nel grande omento fondamentali per la difesa immunitaria, e gli stomi linfatici, aperture tra le cellule mesoteliali che

collegano direttamente la cavità al sistema linfatico per il drenaggio rapido di fluidi e cellule [12], [13].

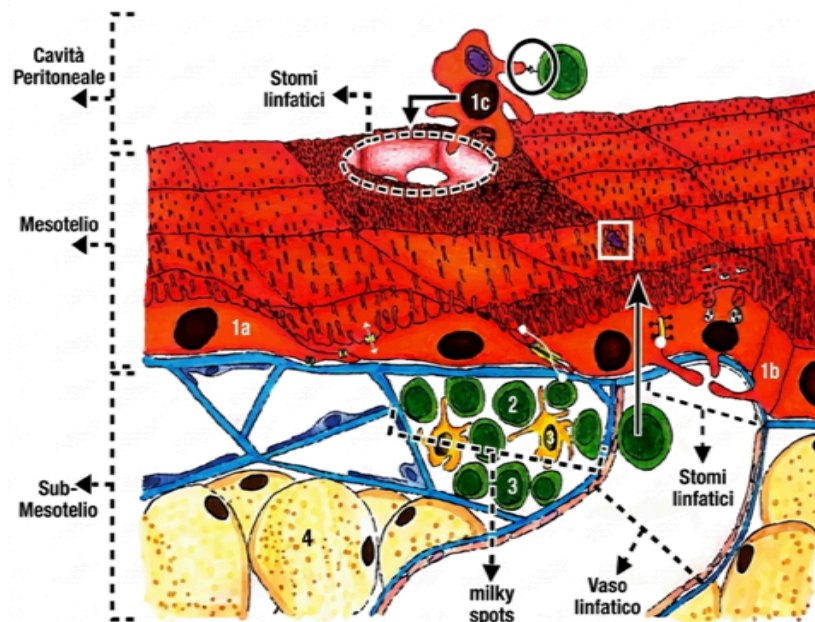


Figura 3: Organizzazione microscopica del tessuto peritoneale. Lo schema illustra la ripartizione strutturale tra la cavità peritoneale, il mesotelio e lo stroma sottomesoteliale (sub-mesotelio).

1.4.2 Dinamismo biologico del tessuto peritoneale

Oggi il peritoneo è riconosciuto come una struttura biologicamente dinamica dotata di funzioni fisiologiche complesse. Esso regola il trasporto selettivo di fluidi e cellule, funge da barriera immunitaria attiva, interviene nella riparazione tissutale e nella formazione delle cicatrici [11], [12]. Un processo cruciale è la Transizione Mesotelio-Mesenchimale (MMT): in risposta a lesioni o infiammazioni, le cellule mesoteliali possono trasformarsi in miofibroblasti per riparare i tessuti, un meccanismo che tuttavia può degenerare nella formazione di aderenze post-chirurgiche e fibrosi se non correttamente bilanciato [11], [13].

Inoltre, il peritoneo gioca un ruolo critico nel controllo della disseminazione tumorale [1].

1.4.3 Differenze anatomiche

Esistono significative differenze anatomiche legate al sesso. Nell'uomo il peritoneo forma una cavità completamente chiusa, mentre nella donna essa comunica indirettamente con l'esterno attraverso le tube di Falloppio, le cui estremità addominali si aprono nella cavità peritoneale.

Un'ulteriore peculiarità dell'anatomia femminile riguarda la superficie ovarica: a differenza degli altri organi intraperitoneali, le ovaie sono rivestite dall'epitelio germinale, sostenuto dalla tunica albuginea (tessuto connettivo denso irregolare) in continuità con il peritoneo. Poiché deriva dal mesotelio celomatico, l'epitelio ovarico condivide con quello peritoneale numerose caratteristiche strutturali, immunoistochimiche e molecolari [1], [11].

Queste differenze hanno portato a ipotizzare un possibile ruolo del sesso nella suscettibilità alla formazione di aderenze post-operatorie. A questo proposito, si è osservata una maggiore frequenza di aderenze nelle pazienti sottoposte a interventi addominali o ginecologici rispetto ai pazienti maschi. Tuttavia, poiché per il resto il peritoneo viscerale e parietale presenta caratteristiche sostanzialmente sovrapponibili nei due sessi, le evidenze attualmente disponibili non consentono di stabilire con certezza se il sesso rappresenti un fattore determinante univoco nello sviluppo delle aderenze [1].

2. Fisiopatologia e modelli di formazione delle aderenze

2.1 Evoluzione dei modelli di formazione delle aderenze post-operatorie

La comprensione dei meccanismi responsabili della formazione delle aderenze post-operatorie si è evoluta notevolmente nel corso degli anni.

Già nel 1919 fu osservato che la guarigione del peritoneo differisce significativamente da quella delle ferite cutanee. A differenza dell'epidermide, che si rigenera progressivamente a partire dai margini della lesione, il mesotelio tende a riformarsi simultaneamente sull'intera superficie danneggiata. Questa osservazione suggerì precocemente che i meccanismi di riparazione peritoneale

fossero peculiari e non completamente assimilabili a quelli delle altre ferite chirurgiche [1].

2.1.1 Modello fibroblastico classico

Per molti decenni, il modello predominante ha attribuito ai fibroblasti un ruolo centrale e quasi esclusivo nella formazione delle aderenze. Secondo questa teoria, il trauma chirurgico innesca una cascata infiammatoria che aumenta la permeabilità vascolare, portando al rilascio di un essudato ricco di fibrinogeno che viene convertito in ponti fibrinosi tra le superfici lesionate. In condizioni di guarigione normale, il sistema fibrinolitico degraderebbe questa matrice; tuttavia, l'intervento chirurgico spesso determina una condizione di ischemia che sopprime l'attività fibrinolitica, permettendo alla fibrina di persistere [3], [14].

Queste strutture fibrinose fungono da impalcatura temporanea per la migrazione dei fibroblasti, i quali depositano progressivamente collagene e matrice extracellulare (ECM), trasformando il coagulo iniziale in tessuto cicatriziale permanente [14].

Le osservazioni istologiche delle aderenze mature sembravano inizialmente supportare questa visione, poiché il tessuto aderenziale risultava costituito prevalentemente da fibroblasti e collagene. Studi successivi hanno però rivelato una composizione molto più complessa e dinamica, dimostrando la presenza di macrofagi, eosinofili, mastociti, eritrociti e detriti cellulari.

Un contributo fondamentale è venuto dalle ricerche storiche di Milligan e Raftery (1974) per aver identificato all'interno delle aderenze anche cellule endoteliali e fibre nervose. Tali evidenze suggeriscono che le aderenze non siano semplici cicatrici inerti, ma tessuti vivi e vascolarizzati; la presenza di vasi garantisce loro stabilità biologica, mentre la componente nervosa contribuisce direttamente alla comparsa di dolore cronico nei pazienti [3], [15].

Sebbene il modello fibroblastico abbia rappresentato per anni il paradigma dominante, esso presentava dei limiti concettuali: non spiegava in modo soddisfacente l'esatta origine dei miofibroblasti né riconosceva un ruolo attivo alle

cellule mesoteliali, che venivano considerate semplici spettatrici della riparazione tissutale. Questo ha aperto la strada a modelli più recenti che vedono nel mesotelio il vero protagonista della risposta fibrotica [16].

2.1.2 Modello della transizione mesotelio-mesenchimale (MMT)

Un'importante svolta concettuale nella comprensione della fibrosi aderenziale si è verificata nel 2003 con lo studio di Yáñez-Mó, il quale suggerisce una diversa origine per le cellule responsabili del processo [1]. Secondo questa ipotesi, i miofibroblasti presenti nelle aderenze non deriverebbero esclusivamente dal reclutamento di cellule dai tessuti sottostanti, ma potrebbero originare direttamente dalle cellule mesoteliali (MC) attraverso un processo di trasformazione attiva. In condizioni fisiologiche, le MC costituiscono un monostrato protettivo che riveste le cavità sierose, agendo come una barriera semipermeabile e secernendo lubrificanti come glicosaminoglicani e fosfolipidi con proprietà surfattanti per minimizzare l'attrito tra gli organi [16], [17].

In seguito a un trauma chirurgico o a stimoli infiammatori, queste cellule possono subire una riprogrammazione genetica nota come Transizione Mesotelio-Mesenchimale (MMT). Durante questo processo, guidato dal repressore trascrizionale SNAIL1 e da citochine come il TGF- β 1 e l'IL-1 β , le cellule mesoteliali perdono progressivamente la loro morfologia epiteliale, evidenziata da un calo di marcatori come la citocheratina e la E-caderina, per acquisire un fenotipo mesenchimale migratorio e invasivo [14], [17].

Successivamente, gli studi di Sandoval hanno rafforzato questa ipotesi, dimostrando che le MC trasformate acquisiscono proprietà simili a quelle dei miofibroblasti, diventando capaci di esprimere α -SMA e di migrare nella zona submesoteliale [1], [17]. Qui, esse collaborano con i fibroblasti residenti nella deposizione di collagene e altri componenti della matrice extracellulare (ECM), contribuendo direttamente alla formazione del tessuto fibrotico [14], [17]. Ricerche più recenti hanno inoltre evidenziato che le MC in transizione secernono elevati livelli di VEGF, promuovendo la neo-angiogenesi necessaria alla

stabilizzazione dell'aderenza, e che tale processo è mediato dalla via di segnalazione Smad-dipendente [17].

Questo modello ha avuto il merito di spostare l'attenzione scientifica dal ruolo dei soli fibroblasti sottostanti alle cellule mesoteliali, riconoscendole come protagoniste attive e dinamiche della risposta fibrotica post-operatoria [14], [17].

2.1.3 Modello dell'attivazione mesoteliale

Le evidenze scientifiche più recenti hanno ulteriormente ampliato il ruolo attribuito al mesotelio, portando alla formulazione del cosiddetto modello dell'attivazione mesoteliale. In questa visione, le cellule mesoteliali non vengono considerate esclusivamente come una fonte di miofibroblasti attraverso la MMT, ma come vere e proprie regolatrici attive dell'intera cascata che conduce alla formazione delle aderenze [1], [3].

In condizioni fisiologiche, il mesotelio produce sostanze lubrificanti, tra cui glicosaminoglicani e surfattanti, che garantiscono una superficie a basso attrito e contribuiscono a prevenire l'adesione tra organi e tessuti. Dopo una lesione chirurgica, tuttavia, le cellule mesoteliali assumono un fenotipo pro-fibrotico caratterizzato dalla produzione di citochine infiammatorie (come IL-1, IL-6 e TNF- α), chemochine, fattori di crescita e componenti della ECM [14]. Attraverso questi mediatori, esse influenzano direttamente la coagulazione, la fibrinolisi, il reclutamento delle cellule immunitarie e il rimodellamento tissutale.

Tra i principali fattori coinvolti nell'attivazione mesoteliale sono stati identificati il TGF- β 1 e l'IL-6, entrambi in grado di promuovere la MMT e la successiva fibrosi attraverso vie di segnalazione come quella di Smad3 [16].

Dopo il trauma chirurgico, molte cellule mesoteliali vengono rimosse dalla superficie lesionata, interrompendo la continuità del monostrato mesoteliale [17], [18]. Il processo di riparazione avviene mediante il reclutamento di nuove cellule mesoteliali, stimolato da particolari popolazioni di macrofagi intraperitoneali che promuovono la formazione di piccole "isole" cellulari destinate a proliferare fino alla completa rimesotelizzazione della superficie.

Parallelamente, studi di *lineage tracing* hanno identificato una specifica sottopopolazione di cellule mesoteliali attivate caratterizzate dall'espressione della mesotelina (MSLN) e della podoplanina (PDPN), suggerendo che esse rappresentino una componente essenziale e necessaria del tessuto aderenziale sia nell'uomo sia nei modelli animali [3].

Secondo questa teoria, le aderenze originano dalla formazione di ponti cellulari calcio-dipendenti tra superfici mesoteliali danneggiate. La protrusione e la fusione delle membrane mesoteliali costituirebbero quindi uno degli eventi iniziali della cascata adesiva guidati da segnali citoscheletrici, mentre fibroblasti e cellule immunitarie interverrebbero successivamente nel consolidamento e nella maturazione della risposta fibrotica [14], [18].

Se inizialmente i fibroblasti erano considerati gli unici protagonisti del processo, le evidenze più recenti indicano che le cellule mesoteliali svolgono un ruolo centrale sia nelle fasi iniziali sia nelle fasi tardive della formazione delle aderenze, configurandosi come importanti regolatori della risposta infiammatoria, della fibrosi e del rimodellamento tissutale [3], [14].

2.2 Patogenesi delle aderenze post-operatorie

2.2.1 Evoluzione temporale della formazione delle aderenze

La formazione delle aderenze post-operatorie è il risultato di un processo di guarigione peritoneale alterato in seguito a un trauma chirurgico. Tale fenomeno è regolato da una complessa interazione tra cascata coagulativa, risposta infiammatoria, fibrinolisi, angiogenesi e rimodellamento della matrice extracellulare [19], [20].

L'evento scatenante è la lesione del mesotelio e dei tessuti sottostanti durante l'atto chirurgico. Il danno tissutale attiva immediatamente la risposta infiammatoria e la cascata della coagulazione, portando alla formazione di coaguli ricchi di fibrina che fungono inizialmente da emostatici e supporti temporanei per la riparazione dei tessuti [20], [21].

Nelle prime ore successive all'intervento, la trombina catalizza la conversione del fibrinogeno in monomeri di fibrina, i quali polimerizzano creando una rete tridimensionale. Questa struttura aggrega piastrine e cellule infiammatorie costituisce la matrice fibrinosa che funge da substrato essenziale per lo sviluppo delle future aderenze [21], [22].

In condizioni fisiologiche, il sistema fibrinolitico rimuove rapidamente questi depositi. Tuttavia, se la fibrinolisi risulta insufficiente, in particolare durante le prime 48-72 ore, la fibrina persiste nel sito della lesione, venendo progressivamente colonizzata da cellule infiammatorie e fibroblasti [20], [22].

Durante i primi tre giorni, si osserva una prevalente infiltrazione di leucociti polimorfonucleati, monociti e neutrofili. Questa fase è accompagnata dalla produzione di citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita che amplificano la risposta riparativa del tessuto [20].

Tra il terzo e il settimo giorno, la matrice fibrinosa viene infiltrata da fibroblasti, cellule muscolari lisce e nuovi vasi sanguigni, segnando l'inizio della deposizione di collagene e componenti della matrice extracellulare [20], [23].

Entro il settimo giorno, le aderenze presentano già una struttura organizzata, composta da matrice collagenosa, neovascolarizzazione e un rivestimento di cellule mesoteliali [19], [23].

Nel periodo compreso tra il terzo e il ventunesimo giorno, si verifica un'intensa proliferazione fibroblastica con deposizione predominante di collagene di tipo III. Lo sviluppo di una rete capillare rende le aderenze progressivamente più resistenti e difficili da separare chirurgicamente, a causa di un'eccessiva produzione di matrice non bilanciata dalla sua degradazione [23].

Dopo circa tre settimane, le aderenze raggiungono una fase di ulteriore maturazione. In questo stadio sono costituite da fibroblasti quiescenti, miofibroblasti (derivati in gran parte dalla transizione mesoteliale), cellule endoteliali, macrofagi e vasi sanguigni strutturati [20].

Nello stadio finale, si organizza un vero e proprio tessuto cicatriziale ricco di collagene di tipo I. La persistenza di mediatori pro-infiammatori e specie reattive

dell'ossigeno mantiene uno stato infiammatorio cronico che favorisce la definitiva stabilizzazione delle aderenze [20], [22].

2.2.2 Meccanismi fisiopatologici della formazione delle aderenze

La formazione delle aderenze post-operatorie coinvolge tre processi principali (Figura 4):

- L'inibizione dei sistemi fibrinolisi
- La risposta immunitaria e infiammatoria
- L'ipossia e l'angiogenesi

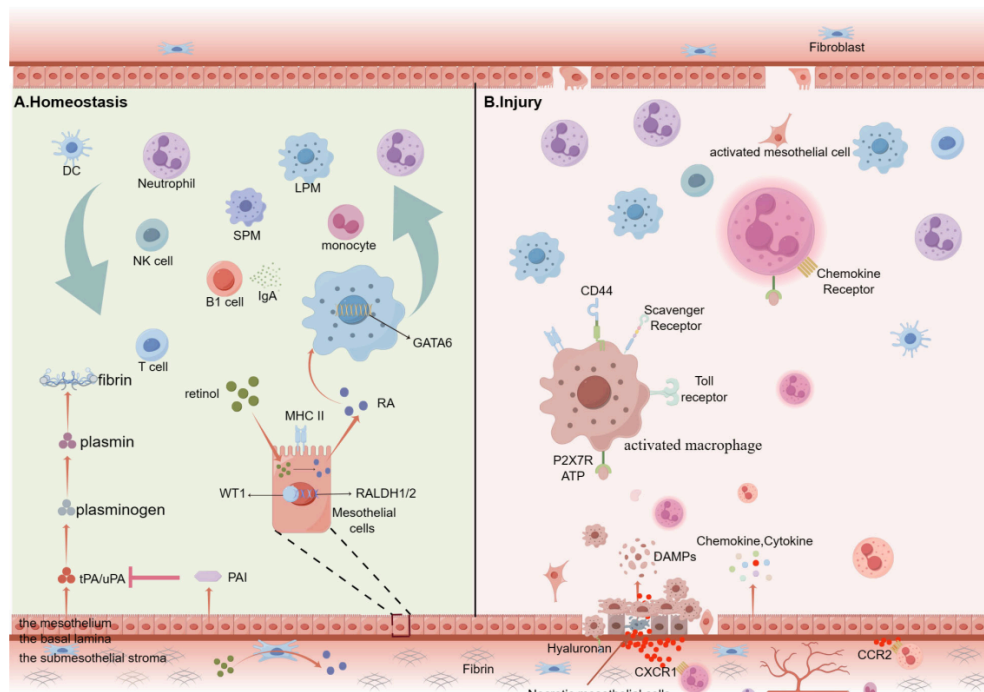


Figura 4: Meccanismi cellulari e molecolari del mesotelio in condizioni di omeostasi e a seguito di danno tissutale.

2.2.2.1 Inibizione dei sistemi di fibrinolisi

A livello fisiologico, la degradazione della fibrina è mediata dalla plasmina, un enzima proteolitico derivante dall'attivazione del plasminogeno. Questo processo è regolato principalmente da due attivatori del plasminogeno:

- l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA)
- l'attivatore urochinasi del plasminogeno (u-PA) [19], [24].

Il t-PA viene rilasciato progressivamente dall'endotelio vascolare danneggiato e la sua attività catalitica aumenta notevolmente in presenza di fibrina, contribuendo alla dissoluzione del coagulo una volta completata la guarigione. L'u-PA, invece, viene rapidamente reclutato sulle membrane cellulari attraverso il legame con il recettore specifico u-PAR, espresso su numerosi tipi cellulari, favorendo la produzione localizzata di plasmina.

Sebbene entrambi partecipino all'attivazione del plasminogeno, il t-PA è l'attore principale nella fibrinolisi del coagulo, mentre l'u-PA svolge prevalentemente funzioni associate alla proteolisi e al rimodellamento della matrice extracellulare [24].

L'attività di entrambi gli attivatori è strettamente regolata dagli inibitori dell'attivatore del plasminogeno (PAI), in particolare PAI-1 e PAI-2, che impediscono la conversione del plasminogeno in plasmina. L'incremento dei livelli di PAI osservato dopo un intervento chirurgico, spesso indotto da ipossia o mediatori dell'infiammazione, determina quindi una riduzione della fibrinolisi e favorisce la persistenza patologica della fibrina [25].

Oltre a degradare la fibrina, la plasmina è strettamente collegata all'attività delle metalloproteinasi della matrice (MMP), enzimi coinvolti nella degradazione dei componenti della matrice extracellulare. L'azione coordinata del sistema fibrinolitico e delle MMP contribuisce al normale rimodellamento dei tessuti durante la guarigione; tuttavia, una riduzione della loro attività favorisce l'accumulo di matrice extracellulare e la progressiva maturazione strutturale delle aderenze [20], [26].

La persistenza della fibrina consente la migrazione e la proliferazione di fibroblasti, cellule mesoteliali e cellule infiammatorie, che organizzano progressivamente il coagulo in una struttura fibrotica stabile. In questo modo, il normale processo di guarigione evolve verso la formazione patologica di aderenze permanenti [26], [27].

2.2.2.2 Risposta immunitaria e infiammatoria

L'infiammazione e la coagulazione sono processi strettamente interconnessi che si alimentano a vicenda in un meccanismo di amplificazione reciproca. Le citochine pro-infiammatorie non solo coordinano il reclutamento e l'attivazione delle popolazioni cellulari immunitarie, ma stimolano direttamente la cascata coagulativa inducendo l'espressione del fattore tissutale (Tissue Factor, TF), l'iniziatore primario del processo di coagulazione [27], [28].

Ricerche sperimentali hanno confermato che l'inibizione dell'espressione del TF è in grado di ridurre sensibilmente la produzione di trombina e, di conseguenza, la deposizione patologica di fibrina.

Durante la risposta infiammatoria, l'integrità delle giunzioni tra le cellule endoteliali viene compromessa, favorendo l'esposizione del TF ai componenti ematici circolanti [27].

Parallelamente, si verifica un incremento della sintesi di TF da parte delle cellule endoteliali e dei macrofagi, contemporaneamente a una promozione dell'attivazione piastrinica che potenzia ulteriormente la risposta pro-coagulante [26], [27].

In questo scenario, l'IL-6 riveste un ruolo di primaria importanza poiché induce direttamente l'espressione del TF. Allo stesso modo, mediatori come TNF- α , IL-1 e IL-12 concorrono al mantenimento dello stato pro-infiammatorio e pro-coagulante che definisce le fasi precoci della formazione delle aderenze [24], [28]. Per contrastare un'eccessiva attivazione della coagulazione, l'organismo dispone di sistemi fisiologici di controllo, tra i quali spicca la via anticoagulante della proteina C. Quando la trombina si lega alla trombomodulina sulla superficie dell'endotelio, attiva la proteina C, che agisce inibendo la formazione di fibrina. Data la correlazione tra i due processi, la riduzione dell'attività trombinica dovrebbe idealmente attenuare anche la risposta infiammatoria; tuttavia, nelle condizioni che portano alla formazione delle aderenze, l'infiammazione stessa può compromettere l'efficacia della via della proteina C. Ciò limita l'azione protettiva

del sistema e favorisce la persistenza di un microambiente pro-infiammatorio e pro-fibrotico [27], [28].

2.2.2.3 Ipossia tissutale e angiogenesi

L'ipossia tissutale costituisce uno dei principi determinanti nella patogenesi delle aderenze post-operatorie. In seguito al trauma chirurgico, l'interruzione della vascolarizzazione e la conseguente riduzione della perfusione ematica determinano un calo della tensione di ossigeno nei tessuti interessati. Questo microambiente ipossico non solo favorisce la persistenza della risposta infiammatoria, ma altera profondamente i normali meccanismi di guarigione tissutale [27], [29].

L'ipossia esercita un'influenza diretta sul sistema fibrinolitico inducendo un incremento nell'espressione degli inibitori del PAI, in particolare del PAI-1. L'elevazione dei livelli di PAI ostacola la conversione del plasminogeno in plasmina, determinando una significativa riduzione della capacità di degradazione della fibrina. La persistenza della matrice fibrinica che ne deriva funge da impalcatura per l'organizzazione strutturale e la stabilizzazione dell'aderenza [20], [28].

In parallelo, le condizioni di ipossia stimolano una produzione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di altre molecole ossidanti, le quali sono responsabili di danno cellulare e di ulteriori alterazioni dei processi riparativi. Lo stress ossidativo agisce come un potente stimolo per l'attivazione dei fibroblasti, promuovendo la sintesi di collagene e la deposizione di ECM, processi che contribuiscono alla definitiva maturazione fibrotica delle aderenze [26].

Un meccanismo strettamente interconnesso all'ipossia è rappresentato dall'angiogenesi, un processo biologico finalizzato a ripristinare l'apporto di ossigeno e nutrienti nei tessuti danneggiati [13]. Il mediatore primario di questo fenomeno è il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), la cui espressione genica viene significativamente incrementata in risposta allo stimolo ipossico. Il VEGF promuove attivamente la proliferazione e la migrazione delle cellule

endoteliali, aumentando la permeabilità vascolare e facilitando la formazione di nuovi vasi sanguigni all'interno del tessuto adesivo. Oltre alla sua funzione pro-angiogenetica, il VEGF è coinvolto nella regolazione della cascata coagulativa, della fibrinolisi e dei processi di rimodellamento della ECM [24], [27].

L'ipossia e l'angiogenesi partecipano inoltre alla trasformazione dei fibroblasti in miofibroblasti, un processo mediato principalmente dal *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β). I miofibroblasti acquisiscono un fenotipo altamente fibrogenico caratterizzato da un'aumentata sintesi di collagene, fibronectina e altri componenti della ECM, favorendo la definitiva stabilizzazione e la maturazione delle aderenze permanenti [27], [28].

Nel complesso, l'ipossia tissutale e l'angiogenesi contribuiscono al mantenimento di un microambiente pro-fibrotico e pro-infiammatorio che altera il normale processo di guarigione e favorisce l'evoluzione delle aderenze verso forme permanenti e organizzate [28].

In sintesi, la formazione delle aderenze post-operatorie può essere interpretata come il risultato dell'interazione tra tre processi fondamentali: l'alterazione della fibrinolisi, l'attivazione della risposta infiammatoria con produzione di citochine e TGF- β , e lo sviluppo di ipossia tissutale con conseguente aumento dell'espressione del VEGF. L'alterazione dell'equilibrio tra questi meccanismi determina il passaggio dalla normale guarigione della ferita alla formazione patologica di aderenze permanenti [20], [29].

2.3 Cellule e pathways coinvolti

La formazione delle aderenze post-operatorie rappresenta un processo dinamico e multifattoriale che poggia su tre pilastri fondamentali: la risposta immunitaria innata, la coagulazione e la risposta cellulare peritoneale. In seguito al danno chirurgico, l'attivazione della cascata della coagulazione e della risposta infiammatoria determina il rilascio di numerosi mediatori solubili prodotti da piastrine, cellule infiammatorie e cellule residenti, che inizialmente guidano i processi di guarigione tissutale [30].

Tra i principali elementi cellulari coinvolti figurano le cellule mesoteliali, che possono andare incontro a transizione mesotelio-mesenchimale (MMT) e diventare una fonte di miofibroblasti, e i fibroblasti residenti (submesoteliali), i quali proliferano e si differenziano in miofibroblasti attivi. Questi ultimi sono caratterizzati dall'espressione di α -smooth muscle actin (α -SMA) e da un'elevata produzione di proteine della ECM, come il collagene di tipo I e III [31]. Partecipano inoltre diverse cellule immunitarie, tra cui macrofagi (fondamentali nel reclutamento cellulare e nella modulazione della fibrosi), neutrofili (che possono formare trappole extracellulari di DNA note come NETs), mastociti e linfociti T [3].

L'interazione reciproca tra queste popolazioni cellulari e i mediatori da esse rilasciati regolano numerosi processi biologici implicati nella formazione delle aderenze, tra cui la risposta infiammatoria, la migrazione cellulare, la proliferazione fibroblastica, l'angiogenesi e il rimodellamento della matrice extracellulare. La progressiva alterazione dell'equilibrio tra questi meccanismi contribuisce al passaggio dal normale processo di guarigione alla formazione patologica di aderenze permanenti [30], [31].

2.3.1 Cellule mesoteliali

In seguito al danno, le cellule mesoteliali acquistano un fenotipo profibrotico, secernendo mediatori infiammatori, chemochine, fattori di crescita e componenti della ECM che contribuiscono alla coagulazione, alla fibrinolisi e al reclutamento delle cellule immunitarie [32].

È stato dimostrato che il TGF- β 1 e l'IL-6 svolgono un ruolo fondamentale nell'induzione della transizione mesotelio-mesenchimale (MMT) peritoneale[33]. Le cellule mesoteliali sono debolmente aderenti alla membrana basale e possono essere facilmente distaccate anche in seguito a piccoli traumi. Quando si verifica un trauma e viene persa la continuità del monostrato epiteliale, vengono reclutate nuove cellule mesoteliali [34]. Secondo i modelli classici, la rimozione dello strato mesoteliale sarebbe necessaria affinché si sviluppino le aderenze: la membrana

basale denudata rappresenterebbe infatti il substrato sul quale la fibrina può aderire tra superfici cellulari e organi, favorendo successivamente l'accumulo di fibroblasti [18], [34].

Tuttavia, attraverso studi di lineage tracing, recenti lavori hanno dimostrato che una sottopopolazione attivata di cellule mesoteliali, piuttosto che i fibroblasti residenti, costituisce l'origine primaria delle aderenze. In particolare, è stata identificata la mesotelina come marker di superficie specificamente iperespresso dalle cellule mesoteliali coinvolte nella formazione delle aderenze sia nei modelli murini sia nell'uomo [34]. Lo stesso gruppo di ricerca ha successivamente identificato nei sistemi citoscheletrici e nei meccanismi di regolazione del calcio i principali effettori della cascata aderenziale. È stato dimostrato che le aderenze post-operatorie vengono inizialmente innescate dalla formazione di ponti di membrana calcio-dipendenti tra superfici mesoteliali nelle fasi precoci successive all'intervento chirurgico. Questi risultati suggeriscono che protrusioni e fusioni di membrana tra superfici mesoteliali rappresentino gli eventi iniziali alla base della formazione delle aderenze, mentre fibroblasti e cellule immunitarie contribuirebbero principalmente alla modulazione e alla perpetuazione della risposta aderenziale [18], [34].

2.3.2 Fibroblasti e miofibroblasti

Inizialmente, in seguito al trauma, si verifica la deposizione di fibrina, che crea una struttura di supporto cellulare fondamentale per favorire la migrazione e l'attecchimento di cellule con fenotipo simil-fibroblastico. Diversi studi hanno dimostrato che la presenza di fibroblasti sub-peritoneali all'interno della matrice extracellulare e la loro attivazione rappresentano passaggi determinanti per lo sviluppo delle aderenze. [32] Con la progressiva evoluzione del processo, i fibroblasti iniziano ad allinearsi e organizzarsi stabilmente, inducendo una successiva deposizione di collagene e di altri componenti della ECM, che culmina nella formazione di aderenze mature e fibrotiche. Nei modelli murini, è stato osservato che la componente fibroblastica aumenta significativamente nei giorni

successivi al trauma, seguita dallo sviluppo di strutture vascolari e connettivali che organizzano il tessuto aderenziale entro le prime due settimane [35]. Le analisi istologiche hanno confermato che i fibroblasti responsabili della maturazione delle aderenze umane sono prevalentemente miofibroblasti, caratterizzati da una spiccata iperplasia e da un'intensa produzione di collagene. Tuttavia, poiché tali evidenze derivano in gran parte da modelli animali e studi istopatologici, i meccanismi cellulari precoci rimangono ancora oggetto di dibattito scientifico [34], [36].

I fibroblasti presenti nelle aderenze possono acquisire un fenotipo di miofibroblasto attivato, spesso irreversibile, contraddistinto dalla sovraespressione di collagene di tipo I e III, MMP, inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMP), fibronectina, VEGF, COX-2 e TGF- β [32], [37]. L'attivazione di questi miofibroblasti e il conseguente rimodellamento proteico della matrice sono identificati come i principali motori della transizione da aderenze lievi a strutture dense e tenacemente fibrotiche. Fibroblasti e miofibroblasti secernono infatti elevate quantità di componenti dell'ECM, tra cui fibronectina, acido ialuronico, glicosaminoglicani e proteoglicani [32]. Inoltre, i miofibroblasti vengono stimolati dal Transforming Growth Factor- β (TGF- β), un fattore di crescita pro-infiammatorio e profibrotico che ne potenzia la migrazione, l'attivazione e la capacità contrattile. Per tale motivo, i meccanismi mediati dai fibroblasti sono considerati un potenziale bersaglio terapeutico per lo sviluppo di strategie mirate nella prevenzione e nel trattamento delle aderenze post-operatorie [33], [37].

2.3.3 Macrofagi

A 24 ore dal trauma, i macrofagi rappresentano una popolazione cellulare predominante nel sito della lesione. Nelle aderenze, essi presentano caratteristiche uniche rispetto alla normale risposta infiammatoria innata [32]. Studi recenti indicano che, mentre il mesotelio attivato induce il reclutamento dei monociti attraverso la secrezione della proteina chemoattrattante MCP-1 (CCL2), il numero di macrofagi residenti (CD11b⁺ F4/80^{hi}) subisce una drastica e persistente

deplezione durante tutto il decorso temporale della formazione delle aderenze. Nonostante ciò, i macrofagi sono considerati fondamentali nell'innescare il processo aderenziale grazie alla loro capacità di secernere mediatori chiave, tra cui l'attivatore del plasminogeno (PA), il suo inibitore (PAI-1) e citochine pro-infiammatorie come l'IL-1), l'IL-6 e il TNF α [32], [36].

In un modello murino, è stato evidenziato come PA e PAI-1 agiscano da chemoattrattanti per i macrofagi, i quali secernono il fattore di crescita epidermico (EGF) inducendo un'iperespressione del suo recettore (HER1) nelle cellule mesoteliali; questo circuito biochimico riduce l'attività fibrinolitica locale, favorendo la persistenza della fibrina [36].

Oltre a richiamare ulteriori cellule immunitarie che alimentano la progressione della risposta aderenziale, i macrofagi coordinano il reclutamento di nuove cellule mesoteliali nel sito lesionato. Essi esercitano inoltre un effetto regolatorio diretto influenzando sia il comportamento fenotipico delle cellule mesoteliali sia il rimodellamento dei componenti della ECM [36]. Nelle aderenze peritoneali, i macrofagi residenti fungono da elementi chiave della risposta immunitaria: la loro prolungata assenza o disfunzione compromette la rimozione programmata delle cellule apoptotiche (PrCR), facilitando l'accumulo di detriti e la formazione di trappole extracellulari che aggravano la fibrosi. È stato inoltre proposto che il sistema di attivazione autocrina mediato dalla chemochina CCL1 e dal suo recettore CCR8 sia un meccanismo cruciale per la migrazione dei macrofagi. L'inibizione di questa interazione è stata associata a una significativa riduzione dello sviluppo delle aderenze, identificando questi segnali come potenziali bersagli terapeutici [32], [36].

2.3.4 Neutrofili

I neutrofili, componenti principali dei leucociti polimorfonucleati (PMN), rappresentano uno dei tipi cellulari più abbondanti nella cavità peritoneale durante le fasi iniziali della formazione delle aderenze. Il loro massiccio afflusso nel sito della lesione è mediato dalla produzione di chemochine e mediatori pro-

infiammatori, come l'IL-8 (CXCL8) e l'IL-1 β , sintetizzati dalle cellule mesoteliali e dalle cellule immunitarie in risposta al danno [34]. È stato dimostrato che le cellule mesoteliali attivate, in particolare quando sottoposte a stress meccanico durante l'intervento chirurgico, agiscono come regolatori immunitari diretti aumentando l'espressione di chemochine specifiche come CXCL1 e MCP-1 (CCL2) per reclutare neutrofili e monociti dal circolo ematico [32].

L'attività dei neutrofili contribuisce alla patogenesi aderenziale attraverso la generazione di ROS, che esercitano un'azione citotossica diretta e possono stimolare i fibroblasti a incrementare la sintesi dei componenti della ECM [34]. Sebbene studi precedenti si siano focalizzati principalmente sul danno mediato dai radicali liberi e dal rilascio di granuli, ricerche recenti hanno identificato un meccanismo patogenetico centrale nella formazione delle trappole extracellulari dei neutrofili (NETs) [32], [34].

I neutrofili reclutati nei siti di aderenza vanno incontro a un processo di morte cellulare che culmina nel rilascio di queste reti di strutture reticolari extracellulari composte principalmente da DNA; tali strutture aumentano l'adesività tra le superfici tessutali e fungono da supporto per la successiva organizzazione fibrotica. La persistenza dei neutrofili e delle NETs, spesso associata a una concomitante deplezione dei macrofagi residenti deputati alla rimozione dei detriti cellulari, favorisce la progressione della risposta infiammatoria verso la formazione di aderenze stabili [32], [33].

2.3.5 Linfociti T

In un modello murino di aderenze peritoneali e viscerali, è stato osservato che i linfociti T raggiungono i livelli più elevati intorno al terzo giorno dopo il danno, suggerendo un coinvolgimento attivo del sistema immunitario adattativo nel processo di formazione [32]. Queste cellule persistono sia quantitativamente che qualitativamente indipendentemente dal grado di maturazione del tessuto, il che indica un'attività infiammatoria costante anche nelle aderenze di lunga durata. Tale evidenza è supportata da analisi istologiche su campioni umani, che mostrano

come le aderenze mature rimangano ricche di cellule mononucleate, dimostrando che il tessuto aderenziale non è una cicatrice inerte ma un ambiente dinamico in continuo rimodellamento [33], [34].

Inoltre, studi funzionali basati sulla deplezione cellulare e sul trasferimento adottivo hanno dimostrato che la formazione delle aderenze richiede specificamente la presenza di linfociti T CD4⁺ $\alpha\beta$ 1 [32].

La caratterizzazione delle aderenze come uno stato di infiammazione cronica suggerisce che i linfociti T possano svolgere un ruolo chiave nelle vie di segnalazione che mantengono attive le aderenze nel tempo. In particolare, l'interazione tra queste cellule e la produzione di citochine come l'IL-6 appare determinante [35].

2.3.6 Mastociti

I mastociti sono stati riscontrati in elevate concentrazioni nei siti di aderenze post-chirurgiche, dove agiscono come importanti cellule pro-infiammatorie e regolatrici della risposta fibrotica. In seguito al trauma, i mastociti rilasciano una vasta gamma di mediatori bioattivi, tra cui istamina, serotonina, citochine, serin-proteasi e chimasi [32]. La chimasi, una serin-proteasi, svolge un ruolo cruciale nell'attivazione del TGF- β , il principale fattore di crescita responsabile della stimolazione dei fibroblasti e dell'induzione della transizione mesotelio-mesenchimale [32], [34].

Oltre ai mediatori infiammatori, i mastociti rilasciano il VEGF, la cui secrezione rappresenta un evento patogenetico precoce fondamentale nella formazione delle aderenze [32].

Questi meccanismi suggeriscono che i mastociti non solo partecipino all'innesco della risposta infiammatoria, ma contribuiscano attivamente alla progressione verso aderenze mature attraverso il reclutamento cellulare e il rimodellamento vascolare della lesione [32], [37].

3. Strategie preventive

3.1 Ottimizzazione della tecnica chirurgica

Il danno chirurgico rappresenta la causa principale della formazione delle aderenze post-operatorie (PAA). Pertanto, l'adozione di una tecnica chirurgica rigorosamente atraumatica costituisce la prima linea di difesa contro la formazione delle aderenze. La prima strategia attuata è la riduzione al minimo il trauma meccanico, termico e chimico al peritoneo per preservarne la naturale capacità fibrinolitica e prevenire la formazione di bande fibrose anomale [38], [39].

Attualmente vengono adottate diverse misure cliniche consolidate come ad esempio l'idratazione dei tessuti. Per prevenire la disidratazione dei tessuti è fondamentale per limitare il danno peritoneale iniziale. Oltre a mantenere l'umidità, è raccomandata una frequente e continua irrigazione dell'area di dissezione con soluzione salina, pratica che aiuta a prevenire la formazione di depositi di fibrina rimuovendo fisicamente i precursori del coagulo e i detriti cellulari [38], [40].

Un'altra accortezza è l'emostasi. Poiché la presenza di sangue e coaguli funge da scaffold per le aderenze, per cui un'emostasi accurata è essenziale. Tuttavia, occorre prestare attenzione all'uso della strumentazione: si raccomanda un uso minimo dell'elettrocauterio monopolare per evitare lesioni termiche diffuse ai tessuti circostanti, che potrebbero compromettere la guarigione [38], [41].

È necessario limitare l'introduzione nel campo operatorio di corpi estranei. Quindi si cerca di eliminare l'uso di materiali potenzialmente reattivi per prevenire infiammazioni persistenti. Un fattore di rischio significativo è rappresentato dall'uso di guanti chirurgici contenenti amido o talco, che devono essere evitati poiché favoriscono reazioni da corpo estraneo e fibrosi. In quest'ottica, l'impiego di suture sottili, inerti e preferibilmente riassorbibili è la strategia d'elezione [39], [40].

Prima della chiusura, è cruciale la rimozione di residui fibrinosi e tessuti devitalizzati che potrebbero evolvere in aderenze permanenti entro i primi 5-7

giorni. Alcuni studi suggeriscono che la non-chiusura del peritoneo possa ridurre le aderenze evitando l'ischemia e la necrosi associate alla trazione della sutura, sebbene i dati clinici rimangano oggetto di dibattito [39], [40].

Un ruolo centrale è svolto dalla scelta dell'approccio chirurgico. La laparoscopia mininvasiva (MIS) offre diversi vantaggi rispetto alla laparotomia: riduce l'ampiezza dell'incisione, minimizza la manipolazione dei tessuti e permette di mantenere un ambiente intraperitoneale chiuso e umido.

In conclusione, sebbene i progressi nelle tecniche chirurgiche abbiano ridotto il rischio di formazione delle PAA, la loro efficacia rimane limitata poiché non possono eliminare completamente il danno tissutale né alterare la risposta immunitaria innata del paziente [38], [39].

3.2 Approccio farmacologico

Gli interventi farmacologici mirano a interferire con la risposta del peritoneo al danno chirurgico, modulando o bloccando i complessi processi bio-molecolari che portano alla formazione delle bande aderenziali. Tali farmaci possono essere somministrati per via sistemica o, preferibilmente, tramite applicazione topica intra-addominale per massimizzare l'efficacia locale e ridurre la tossicità sistemica. Poiché la patogenesi delle PAA è il risultato di un feedback disordinato tra coagulazione, infiammazione e sistema fibrinolitico, le strategie farmacologiche si dividono principalmente in quattro categorie in base al target biologico [39], [42]:

- Farmaci attivi sulla coagulazione: La cascata della coagulazione è il primo processo attivato dal trauma chirurgico. Gli anticoagulanti, come l'eparina e i suoi derivati a basso peso molecolare, gli analoghi della irudina e i bloccanti dei recettori del trombossano A₂, agiscono regolando l'attività della trombina per prevenire l'eccessiva formazione del coagulo e la successiva trasformazione del fibrinogeno in fibrina [39], [41]. Sebbene efficaci in modelli sperimentali, il loro utilizzo clinico rimane limitato dall'elevato rischio di emorragia post-operatoria e dalla difficoltà di

bilanciare la prevenzione delle aderenze con la normale emostasi necessaria per la guarigione [42].

- Farmaci antinfiammatori e antiossidanti: Una risposta infiammatoria eccessiva e persistente, mediata da citochine come TNF- α , IL-1 e IL-6, è un fattore determinante nella fibrosi. Farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), come ad esempio ibuprofene, aspirina, diclofenac o celecoxib, oppure corticosteroidi, come il desametasone o il metilprednisolone, mirano a inibire i mediatori pro-infiammatori e a ridurre l'essudato fibrinoso [39], [42]. Sostanze antiossidanti come la vitamina E, il resveratrolo e la N-acetilcisteina agiscono riducendo lo stress ossidativo e i ROS che danneggiano il mesotelio. Altre molecole come il blu di metilene o il piruvato di etile hanno mostrato potenziale nel ridurre i segnali infiammatori precoci. Tuttavia, la soppressione eccessiva dell'infiammazione può ritardare la riepitelizzazione peritoneale e aumentare il rischio di infezioni o deiscenze anastomotiche [38], [42].
- Agenti fibrinolitici: Questo approccio rappresenta il metodo più diretto per eliminare i depositi di fibrina prima che diventino permanenti. L'uso locale di attivatori del plasminogeno, come il tPA ricombinante, l'uPA e la streptochinasi, mira a potenziare la degradazione della fibrina. Nonostante l'efficacia dimostrata nel dissolvere i coaguli precoci, il rischio di gravi emorragie intraperitoneali e altre complicanze sistemiche ne impedisce un impiego clinico routinario [39], [41]
- Modulatori cellulari e target specifici: Le strategie più recenti mirano a sopprimere la transizione mesotelio-mesenchimale (MMT) e l'eccessiva proliferazione dei fibroblasti. L'adenosina e le statine, come rosuvastatina e simvastatina, possono modulare la risposta infiammatoria e ridurre l'espressione di TGF- β , ostacolando la fibrosi. [38], [41] È stata indagata anche l'interferenza con il sistema renina-angiotensina-aldosterone, tramite Lisinopril o antagonisti del recettore AT1, per bloccare l'angiogenesi e la deposizione di matrice [39].

Nonostante i numerosi studi e i risultati incoraggianti in modelli animali, l'efficacia clinica degli interventi farmacologici isolati rimane insoddisfacente. I limiti principali includono lo scarso targeting, la tossicità sistemica e la rapida clearance dei farmaci dalla cavità peritoneale. Infatti, essi vengono spesso riassorbiti entro 24-48 ore, non coprendo l'intero periodo critico di formazione delle aderenze (5-7 giorni). Per tali ragioni, ad oggi non esistono farmaci specificamente approvati per questa indicazione [38], [39]. La ricerca si sta spostando verso sistemi di rilascio controllato, come i patch o gli idrogeli multifunzionali, capaci di proteggere i farmaci dalla rapida eliminazione e mantenere il principio attivo *in situ* per tempi prolungati, agendo sinergicamente come barriera fisica e piattaforma farmacologica [40].

3.3 Barriere fisiche

Le barriere fisiche rappresentano attualmente l'approccio più pratico ed efficace per prevenire le PAA in ambito clinico. Il loro ruolo fondamentale è agire come un isolante meccanico tra le superfici tissutali lesionate, impedendo che tessuti contigui entrino in contatto diretto durante la fase critica della guarigione mesoteliale, che avviene solitamente tra i primi 5 e 7 giorni dopo l'intervento [38], [43]. A differenza degli approcci farmacologici sistemici, le barriere offrono una protezione localizzata, riducendo il rischio di tossicità sistemica e interferenze con la guarigione di altri tessuti [38].

3.3.1 Requisiti di una barriera fisica ideale

Per garantire un'efficacia clinica reale, una barriera deve soddisfare criteri biologici, meccanici e funzionali [42], [44]:

- **Biocompatibilità:** Il materiale deve essere immunologicamente inerte, non evocare risposte infiammatorie persistenti o reazioni da corpo estraneo, che paradossalmente potrebbero promuovere la fibrosi invece di prevenirla [42];

- Biodegradabilità controllata: La barriera deve persistere *in situ* per l'intero periodo critico di formazione delle aderenze (almeno 7 giorni) e riassorbirsi completamente una volta completata la riparazione del mesotelio (solitamente entro 14-28 giorni), eliminando la necessità di un secondo intervento chirurgico per la rimozione [42], [43];
- Adesione e conformabilità: Deve aderire saldamente alla ferita, anche in ambienti umidi o in presenza di sangue, per resistere alla clearance del fluido peritoneale e ai movimenti fisiologici degli organi, adattandosi a superfici irregolari senza necessità di suture o punti metallici [42], [44];
- Proprietà meccaniche e permeabilità: Deve possedere una robustezza meccanica e una viscoelasticità simili a quelle dei tessuti molli per impedire l'infiltrazione dei fibroblasti, garantendo però la libera diffusione di nutrienti e metaboliti essenziali per la rigenerazione tissutale [40], [42];
- Funzione farmacologica: Le prospettive più recenti mirano a trasformare la barriera da passiva ad attiva, dotandola della capacità di veicolare molecole mirate, come antibiotici, antinfiammatori o agenti anti-fibrotici, con un rilascio controllato [40], [42].

3.3.2 Meccanismi d'azione

Le barriere fisiche operano attraverso principi biomeccanici e chimico-fisici che mirano a neutralizzare la naturale tendenza del peritoneo lesionato a formare ponti fibrosi. Sulla base delle recenti evidenze scientifiche, i meccanismi principali sono così classificati (*Figura 5*) [38]:

- Separazione Meccanica (Effetto Barriera): Rappresenta il meccanismo d'elezione per i film e gli idrogeli. Il materiale funge da isolante meccanico, impedendo fisicamente il contatto tra le superfici serosalie danneggiate durante la finestra temporale critica della guarigione mesoteliale [43], [44]. Questo ostacolo impedisce alla matrice di fibrina neoformata di collegare tessuti adiacenti, evitando che essa funga da impalcatura per l'infiltrazione dei fibroblasti e la successiva deposizione di collagene. Per essere efficace,

la barriera deve possedere una resistenza meccanica tale da sopportare le forze di taglio generate dai movimenti intestinali e dalla pressione intra-addominale [40], [42];

- **Idroflottazione:** questo principio è sfruttato principalmente dalle soluzioni liquide a base di polimeri. Consiste nell'instillazione di volumi variabili di liquido nella cavità peritoneale per mantenere gli organi separati l'uno rispetto all'altro. L'aumento del volume del fluido peritoneale riduce la probabilità che aree lesionate contigue rimangano in contatto prolungato, prevenendo l'organizzazione del coagulo di fibrina in bande aderenziali [43]. Tuttavia, l'efficacia è spesso limitata dal rapido riassorbimento peritoneale delle soluzioni comuni [44];
- **Proprietà Anti-fouling:** questo meccanismo avanzato si basa sulla creazione di uno strato di idratazione stabile sulla superficie della barriera. L'uso di polimeri super-idrofili, come il PEG, o zwitterionici permette di legare molecole d'acqua tramite legami idrogeno o interazioni elettrostatiche, formando una barriera ad alta energia che respinge l'adsorbimento non specifico di proteine e l'adesione cellulare [42]. La repulsione sterica, causata dalla compressione delle catene polimeriche flessibili sulla superficie, impedisce fisicamente alla fibrina e ai fibroblasti di ancorarsi al sito della ferita, bloccando la cascata aderenziale a livello molecolare [38];
- **Modulazione del Microambiente (Barriere Attive):** oltre alla semplice separazione, le barriere di nuova generazione agiscono modificando attivamente il sito chirurgico. Esse possono fungere da piattaforme di drug-delivery localizzato, rilasciando agenti farmacologici in modo controllato o "on-demand", ad esempio in risposta ai livelli di ROS o al pH [38], [41]. Questo approccio permette di contrastare simultaneamente l'infiammazione persistente e le infezioni subcliniche, che sono tra i principali promotori del fallimento delle barriere meccaniche tradizionali [42].

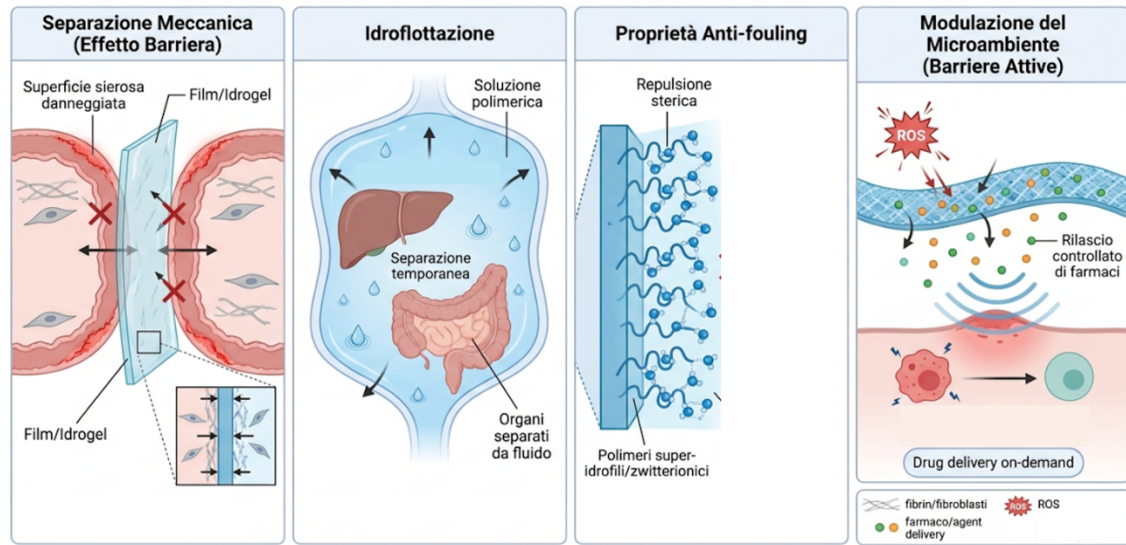


Figura 5: Panoramica delle principali strategie ingegneristiche e approcci terapeutici per la prevenzione delle aderenze post-operatorie (immagine creata con FigureLabs).

3.4 Dispositivi e prodotti commerciali

I dispositivi per la prevenzione della formazione delle aderenze post-operatorie si sono evoluti da semplici membrane passive a sistemi complessi in grado di adattarsi alle diverse tecniche chirurgiche (laparotomia vs laparoscopia) e alle specifiche necessità anatomiche [43], [44]. I dispositivi ad oggi utilizzati possano essere classificati nel seguente modo:

3.4.1 Soluzioni liquide

Questi prodotti, come ad esempio Adept® (a base di Icodestrina al 4%) e Sepracoat® (a base di acido ialuronico), operano principalmente attraverso il meccanismo della idroflottazione, con l'obiettivo di creare un serbatoio di fluido che mantenga distanziate le superfici sierose durante la fase di riepitelizzazione. Il principale vantaggio risiede nella loro natura fluida, che permette una copertura globale e uniforme dell'intera cavità peritoneale, risultando estremamente semplici da instillare attraverso i trocar laparoscopici [45].

Tuttavia, la loro efficacia è spesso limitata da una cinetica di riassorbimento rapida: mentre le comuni soluzioni saline (elettrolitiche) scompaiono in poche ore, l'icodestrina garantisce una permanenza superiore ai 4 giorni, che però potrebbe

non coprire l'intera settimana critica [46]. Inoltre, per effetto della gravità, questi liquidi tendono ad accumularsi nelle zone declivi come lo scavo di Douglas, lasciando potenzialmente scoperte le aree superiori. In alcuni studi su interventi colorettali, l'impiego di Adept ha paradossalmente esacerbato l'ileo postoperatorio, ritardando la normale ripresa del transito intestinale e sottolineando la necessità di seguire protocolli di volume rigorosi.

3.4.2 Film e membrane solide

Le membrane, come ad esempio Seprafilm® (a base di acido ialuronico e carbossimetilcellulosa), Interceed® (a base di cellulosa rigenerata ossidata) e Gore-Tex® (a base di PTFE), agiscono come isolanti meccanici sito-specifici. Offrono una permanenza sul sito altamente prevedibile e una stabilità meccanica superiore. Il Seprafilm, ad esempio, si trasforma in un gel protettivo entro 24 ore e viene escreto solo dopo 28 giorni [38], [47]. Tuttavia, la manipolazione intraoperatoria è complessa: queste membrane sono fragili allo stato secco e diventano estremamente adesive appena inumidite, rendendo difficile il posizionamento accurato in laparoscopia [44], [47]. L'efficacia di Interceed è inoltre gravemente compromessa in presenza di sangue, richiedendo un'emostasi perfetta. Clinicamente, l'applicazione di Seprafilm direttamente su suture intestinali fresche è stata associata a un rischio significativo di deiscenza anastomotica e ascessi addominali, motivo per cui se ne sconsiglia il contatto diretto con le anastomosi [47].

3.4.3 Idrogeli e spray

Rappresentano la frontiera tecnologica più avanzata e sono SprayGel® o SprayShield™ (a base di PEG) e Hyalobarrier® (a base di acido ialuronico autocross-linkato), combinando la versatilità dei liquidi con la persistenza dei solidi [44], [45]. Grazie alla capacità di gelificare *in situ* tramite reazioni chimiche rapide, questi sistemi si conformano perfettamente a superfici anatomiche irregolari e ferite complesse [44]. L'applicazione spray permette una

visualizzazione chiara dell'area trattata, spesso facilitata da coloranti come il blu di metilene. Questi dispositivi offrono un'elevata biocompatibilità e una permanenza di 1-2 settimane, proteggendo il tessuto durante l'intera fase di rischio [42], [44]. Nonostante il grande potenziale, molti idrogeli attuali mostrano ancora una resistenza meccanica limitata contro le forze di taglio intestinali [44].

3.5 Evoluzione delle barriere: scaffold multifunzionali ed avanzati

La prevenzione delle aderenze post-operatorie rappresenta una sfida clinica complessa che richiede l'evoluzione da barriere fisiche passive a sistemi multifunzionali avanzati. L'attuale ricerca scientifica mira a modulare attivamente il microambiente chirurgico integrando tecnologie capaci di superare i limiti dei dispositivi tradizionali [48]. L'innovazione si sviluppa attraverso tre pilastri fondamentali: la tecnologia di electrospinning per la creazione di membrane biomimetiche e selettive, l'adozione di architetture bilayer per ottenere funzioni asimmetriche di adesione e isolamento, e l'implementazione del caricamento farmacologico localizzato per un'azione biochimica mirata e prolungata sul sito della lesione [49], [50], [51].

3.5.1 Electrospinning

L'elettrofilatura (electrospinning) si è affermata come una tecnica di fabbricazione estremamente versatile, semplice ed efficiente per la produzione di membrane nanofibrose destinate ad applicazioni biomediche avanzate. Questo processo si basa sull'applicazione di un'alta tensione a una soluzione polimerica: la carica elettrica genera una forza repulsiva che vince la tensione superficiale del fluido, accelerando un getto di polimero attraverso un ago verso un collettore [48], [52]. Il risultato è la formazione di strutture fibrose che possiedono proprietà uniche, quali un'elevatissima superficie specifica, pori interconnessi e prestazioni meccaniche superiori [49], [52]. Grazie alla nanodimensione delle fibre, queste membrane richiamano fedelmente la struttura della ECM naturale. La presenza di pori favorisce i flussi metabolici, garantendo il libero scambio di nutrienti,

ossigeno e prodotti di scarto essenziali per la normale guarigione del sito chirurgico [52]. Altre caratteristiche essenziali sono l'adesione spontanea e facilità d'uso. Infatti, a differenza dei film tradizionali, le membrane elettrofilate sono caratterizzate da un'elevata flessibilità che permette loro di adattarsi alle morfologie complesse degli organi interni. Un vantaggio cardine è la loro capacità di aderire alle ferite tramite un meccanismo di adsorbimento iniziale. Questo elimina la necessità di ricorrere a suture chirurgiche, che sono spesso esse stesse causa di ulteriore infiammazione e possibili nuovi focolai di aderenze [48], [52]. La tecnologia di electrospinning permette il controllo sulla morfologia dello scaffold. Per ottenere fibre ultrafini e uniformi, è possibile modulare con precisione diverse variabili: le proprietà della soluzione (viscosità, concentrazione, peso molecolare, tensione superficiale e conduttività), le condizioni operative (tensione applicata, distanza ago-collettore, velocità di flusso) e i parametri ambientali come temperatura e umidità [52]. Le fibre elettrofilate sono progettate per essere biocompatibili e biodegradabili, metabolizzandosi in prodotti non tossici che il corpo può eliminare senza necessità di un secondo intervento. La loro funzione di barriera è temporanea ma fondamentale: esse mantengono separate le superfici tissutali durante il periodo critico della formazione delle aderenze, stimato tra i 3 e i 14 giorni post-intervento, scomparendo gradualmente man mano che il mesotelio si rigenera [50], [51]. Oltre all'isolamento fisico, le fibre possono fungere da vettori per il rilascio localizzato di farmaci. L'integrazione di antibiotici, antinfiammatori o agenti naturali direttamente nelle fibre permette di controllare il microambiente infiammatorio locale e prevenire infezioni subcliniche, che sono tra i principali motori della fibrosi persistente [50].

3.5.2 Solvent casting

La tecnica del solvent casting (evaporazione di solvente) rappresenta uno dei metodi più affidabili e utilizzati per la fabbricazione di film polimerici destinati al settore biomedico, grazie alla sua praticità e ai costi contenuti rispetto a tecnologie più sofisticate. Il processo si articola in fasi sequenziali e controllate: la

dissoluzione del polimero e degli eventuali agenti plasticizzanti in un solvente volatile idoneo, il colaggio (casting) della soluzione su un supporto inerte, essiccamento e la successiva rimozione del film.

Le proprietà chimico-fisiche e strutturali dei dispositivi ottenuti dipendono fortemente dai parametri della soluzione, come la viscosità e la concentrazione dei solidi, e dalle condizioni di essiccamento (temperatura, tempo e velocità), che influenzano direttamente lo spessore finale, la stabilità e il contenuto di umidità del film. Sebbene queste membrane agiscano primariamente come barriere fisiche per isolare meccanicamente i tessuti ed evitare contatti anomali, la loro porosità è fondamentale in quanto permette il passaggio e il libero scambio di gas, fluidi, nutrienti e sostanze bioattive necessari al letto della ferita per sostenere attivamente i processi fisiologici di rigenerazione cellulare.

Inoltre, i film polimerici offrono la possibilità di incorporare all'interno di specifiche sostanze funzionali o polimeriche capaci di potenziare sinergicamente l'effetto barriera, modulare le proprietà reologiche e promuovere un microambiente idratato ottimale per la riparazione del tessuto lesionato [53].

3.5.3 Sistemi bilayer

L'attuale frontiera nella rigenerazione dei tessuti risiede nello sviluppo di membrane basate su un design integrato "struttura-funzione", un approccio che mira a superare l'incapacità dei dispositivi monostrato di bilanciare requisiti biologici spesso contrastanti. La sfida principale risiede nel fatto che una singola matrice raramente può garantire simultaneamente un'adesione robusta alla lesione, un'efficace funzione barriera e proprietà terapeutiche attive [48], [52]. Per risolvere questa dicotomia, la ricerca si è orientata verso i sistemi bilayer, strutture complementari in cui due strati con proprietà fisico-chimiche distinte operano in sinergia per manipolare il microambiente chirurgico [49].

Nell'architettura a doppio strato, uno strato è progettato per prevenire la formazione di aderenze e per conferire al dispositivo un'adeguata resistenza meccanica in condizioni operative umide e dinamiche. In parallelo, il secondo

strato favorisce i normali processi di riparazione tissutale, sostenendo un microambiente fisiologico per le cellule mesoteliali e agevolando lo scambio di nutrienti e metaboliti indispensabili alla guarigione.

3.5.4 Caricamento farmacologico localizzato

Il passaggio fondamentale verso una barriera "attiva" è rappresentato dal drug-delivery localizzato. Fino ad oggi, diversi agenti farmacologici sono stati utilizzati come terapia singola o sistemica senza ottenere miglioramenti significativi; i farmaci somministrati per via generale possono infatti alterare la farmacocinetica globale, essere rapidamente eliminati dalla cavità addominale a causa della rapida clearance peritoneale, oppure se utilizzati a dosaggi inappropriati nel tentativo di controllare l'infiammazione possono causare grave tossicità tessutale o mutazioni del DNA [54].

Per questo motivo è fortemente raccomandato che, accanto a una barriera fisica (meccanica), sia presente anche una barriera chimica capace di agire terapeuticamente sull'area lesionata durante l'intero periodo critico della formazione delle aderenze, stimato tra i 3 e i 14 giorni post-intervento. L'incorporazione di principi attivi direttamente nello scaffold permette un rilascio controllato e prolungato nel tempo, controllando localmente il microambiente infiammatorio attraverso l'azione mirata di diversi agenti [48], [54].

L'integrazione di antibiotici o agenti naturali all'interno delle fibre è cruciale per prevenire le infezioni del sito chirurgico (SSI), che rappresentano circa il 14% delle infezioni ospedaliere post-operatorie. Le infezioni sono infatti potenti motori dell'infiammazione persistente, la quale aumenta l'essudato, inibisce la fibrinolisi naturale e promuove la conversione dei primi filamenti di fibrina in aderenze fibrose permanenti. Sistemi compositi caricati con farmaci o polimeri bioattivi garantiscono un ambiente sterile favorendo la riparazione del mesotelio e inibendo la crescita batterica.

Scaffold caricati con antinfiammatori (FANS come celecoxib o ibuprofene) o agenti anti-fibrotici hanno dimostrato di poter sopprimere la proliferazione

cellulare anomala e la deposizione disordinata di collagene di tipo I e III da parte dei fibroblasti [55].

Questo approccio combinato mira a colmare il divario tra il potenziale preclinico e l'applicabilità clinica, offrendo una soluzione capace di modulare attivamente il microambiente peritoneale, soprattutto negli scenari chirurgici più complessi [49], [55].

4. Biomateriali

Lo sviluppo di uno scaffold ideale per la chirurgia addominale non mira solo alla rigenerazione, ma deve agire come un dispositivo multifunzionale capace di interferire con la complessa cascata biochimica che porta alla fibrosi. Indipendentemente dalla tecnica di fabbricazione, i requisiti fondamentali devono essere declinati in funzione della prevenzione delle aderenze [44], [48].

La letteratura distingue nettamente i biomateriali in due grandi classi, ciascuna con ruoli critici e complementari nella gestione del sito chirurgico e nella prevenzione delle aderenze. I polimeri sintetici (come il PLA, il PCL e il PLGA) sono scelti principalmente per la loro elevata riproducibilità e per la capacità di fornire un supporto strutturale robusto, agendo come una vera e propria colonna vertebrale meccanica per il dispositivo [52]. Questi materiali offrono prestazioni meccaniche superiori, fondamentali per sopportare le pressioni endo-addominali. Inoltre, permettono di modulare con precisione la cinetica di degradazione attraverso la manipolazione del loro peso molecolare o della loro composizione chimica. Grazie alla loro degradazione controllabile, i polimeri sintetici garantiscono una funzione barriera prolungata che copre l'intero periodo critico della guarigione [49], [52].

Dall'altro lato, i polimeri naturali (come i polisaccaridi) sono apprezzati per l'eccezionale biocompatibilità e per la capacità di mimare fedelmente la ECM naturale [48]. Questi materiali possiedono gruppi funzionali attivi (ossidrilici, amminici e carbossilici) che facilitano l'adesione tissutale "sutureless" e la sintonizzabilità funzionale, agendo come modulatori attivi del microambiente.

Tuttavia, i polimeri naturali presentano spesso una degradazione in vivo troppo rapida e una debolezza meccanica intrinseca che ne limita l'efficacia se utilizzati come barriere isolate. Per superare questi limiti, la strategia più innovativa risiede nell'integrazione sinergica tra le due classi: l'uso di rinforzi sintetici o tecniche di crosslinking [49], [50].

4.1 PLGA

L'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) è un copolimero sintetico derivato dall'acido lattico (LA) e dall'acido glicolico (GA) (*Figura 6*), ampiamente riconosciuto come uno dei biomateriali più versatili per lo sviluppo di barriere anti-aderenziali e sistemi di rilascio controllato di farmaci. Appartiene alla famiglia dei poliesteri alifatici ed è estensivamente utilizzato in campo biomedico grazie alla sua eccellente biocompatibilità e alla capacità di degradarsi in sottoprodotti metabolici non tossici (acido lattico e glicolico) eliminabili naturalmente dall'organismo sotto forma di acqua e anidride carbonica [56], [57].

Una delle caratteristiche più rilevanti del PLGA è la possibilità di modulare la cinetica di degradazione variando il rapporto tra i suoi monomeri; l'aumento della quota di acido glicolico incrementa l'idrofilia del polimero, accelerandone il riassorbimento (con il rapporto 50:50 che presenta la degradazione più rapida), mentre una maggiore percentuale di acido lattico ne aumenta la stabilità e la persistenza in situ [56], [57].

Nel contesto della prevenzione delle aderenze post-operatorie, il PLGA può svolgere una duplice funzione cruciale: agisce come barriera fisica robusta che isola le superfici tissutali lesionate e funge da vettore per il drug-delivery localizzato [44]. Grazie alle sue elevate proprietà meccaniche, fornisce l'integrità strutturale necessaria allo scaffold per resistere alle sollecitazioni dell'ambiente addominale, sopportando le pressioni fisiologiche senza subire delaminazioni premature [58]. Tuttavia, la natura intrinsecamente idrofobica del PLGA può limitare la sua capacità di aderire spontaneamente ai tessuti umidi e può indurre reazioni infiammatorie se la degradazione è troppo lenta rispetto ai tempi di

guarigione. Per superare questi limiti, la ricerca attuale si focalizza sul blending fisico o sulla modifica chimica del PLGA con agenti idrofili, come il PEG o glicosaminoglicani. [56], [57]. Questo approccio permette di migliorare la bagnabilità del film, ottimizzando l'interazione con il mesotelio e garantendo che la funzione barriera persista per l'intero periodo critico della guarigione (3-14 giorni), favorendo al contempo una rigenerazione tissutale ordinata e priva di fibrosi [56].

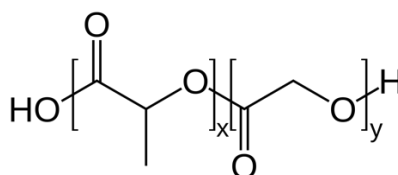


Figura 6: Struttura chimica dell'acido poli(lattico-co-glicolico (PLGA)).

4.2 Destrano

Il destrano è un polisaccaride naturale di riserva, classificato chimicamente come un glucano ramificato complesso, composto principalmente da unità di glucosio unite da legami α -1,6-glucosidici (Figura 7). Una delle proprietà fisiche più rilevanti per la prevenzione delle aderenze è l'elevata capacità di rigonfiamento (swelling) dello scaffold. Questa transizione, che avviene a seguito di un opportuno processo di crosslinking necessario a stabilizzare la struttura ed evitarne la prematura dissoluzione, permette alla matrice di assorbire l'essudato della ferita e di mantenere un'interfaccia idratata tra i tessuti [44], [56].

Dal punto di vista biologico, il destrano svolge un ruolo attivo unico: è in grado di stimolare significativamente la fibrinolisi e la trombolisi locale, inibendo la formazione precoce dei coaguli di sangue che servirebbero da impalcatura per le aderenze fibrose [56]. Inoltre, studi riportano la sua capacità di modulare la risposta immunitaria controllando l'attività delle cellule infiammatorie nel sito chirurgico [44].

Nel design di scaffold avanzati, il destrano viene spesso combinato con altri polimeri, in particolare con il chitosano, per formare gel o fibre capaci di agire come barriere fisiche e chimiche simultanee. Questa sinergia permette di bilanciare

l'inibizione della proliferazione dei fibroblasti con la promozione della guarigione tissutale fisiologica, impedendo al contempo la colonizzazione batterica grazie alle proprietà antimicrobiche del polimero [44], [56]. In questo contesto, l'impiego di tecniche di crosslinking si rivela fondamentale per ottimizzare le caratteristiche intrinseche del destrano. Attraverso la formazione di una rete tridimensionale stabile, la reticolazione non solo previene la rapida degradazione del polimero, ma ne migliora significativamente le proprietà meccaniche e strutturali, consentendo di sfruttare appieno la sua elevata capacità di rigonfiamento per un'efficiente e prolungata prevenzione delle aderenze post-operatorie.

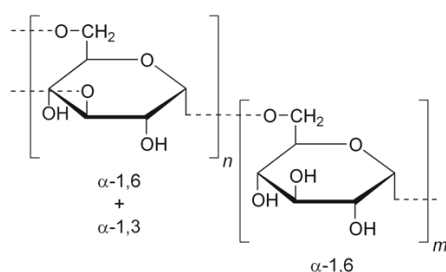


Figura 7: Struttura chimica del destrano

4.3 Chitosano

Il chitosano è un polimero naturale ottenuto dalla deacetilazione della chitina, il principale componente del guscio degli artropodi. Chimicamente, si distingue per essere un polisaccaride cationico, l'unico di origine naturale a possedere una carica netta positiva in ambiente fisiologico [44]. Questa caratteristica è alla base della sua eccezionale capacità emostatica: il chitosano interagisce elettrostaticamente con le membrane dei globuli rossi, che sono cariche negativamente, promuovendo una rapida agglutinazione e innescando l'attivazione piastrinica e la cascata della coagulazione [56]. L'arresto immediato del sanguinamento è un requisito critico per prevenire le aderenze, poiché evita che il versamento ematico funga da impalcatura per i ponti di fibrina.

Oltre alla funzione emostatica, il chitosano possiede spiccate proprietà antibatteriche e antiossidanti. È in grado di inibire la crescita di ceppi patogeni

comuni, riducendo il rischio di infezioni del sito chirurgico che alimenterebbero l'infiammazione pro-fibrotica. Dal punto di vista biochimico, il chitosano ha dimostrato la capacità di inibire l'espressione del TGF- β , una molecola chiave nella formazione delle aderenze [44], [57]. Negli ultimi studi l'attenzione è stata focalizzata sull'impiego del chitosano oligosaccaride (*Figura 8*), una variante a basso peso molecolare ottenuta per depolimerizzazione del polimero nativo. Rispetto al chitosano standard, l'oligosaccaride garantisce una solubilità in acqua drasticamente superiore a pH fisiologico e una minore viscosità, proprietà tecnologiche fondamentali che ne agevolano la lavorabilità e ne massimizzano l'efficacia biologica nel sito di applicazione [57].

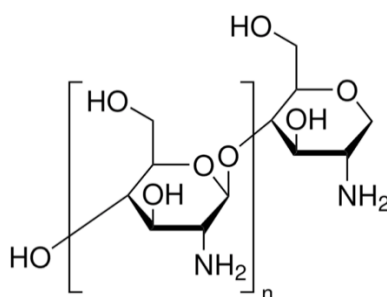


Figura 8: Struttura chimica del chitosano oligomero

4.4 Condroitin solfato

Il condroitin solfato (*Figura 9*) appartiene alla famiglia dei glicosaminoglicani solfati (sGAG), componenti fondamentali della ECM e dei tessuti connettivi [42]. Il condroitin solfato svolge un ruolo primario nel mantenimento dell'omeostasi idrica e delle proprietà lubrificanti delle membrane sierose, facilitando lo scorrimento degli organi e riducendo l'attrito meccanico, uno dei principali inneschi della risposta aderenziale.

La letteratura scientifica associa ai sGAG importanti proprietà antinfiammatorie e anti-fibrotiche [57]. L'inclusione del condroitin solfato negli scaffold multifunzionali mira a modulare attivamente il microambiente della lesione, riducendo la formazione di tessuto fibroso. Inoltre, la presenza di gruppi solfati sulla catena polimerica contribuisce a regolare la risposta immunitaria locale, favorendo una guarigione tissutale ordinata [42].

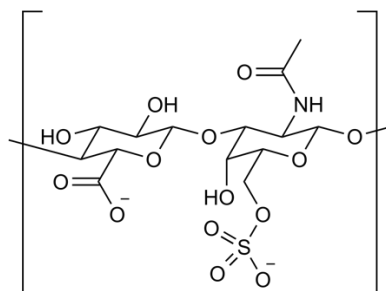


Figura 9: Struttura chimica del condroitin solfato

4.5 Acido ialuronico

L'acido ialuronico è un polimero lineare naturale appartenente alla famiglia dei glicosaminoglicani, composto da unità ripetitive di N-acetil-D-glucosamina e acido D-glucuronico. In quanto componente fondamentale della ECM, è ampiamente distribuito nei tessuti connettivi, nel liquido sinoviale, nell'umor vitreo e nelle pareti dei vasi sanguigni, distinguendosi per un'eccezionale biocompatibilità e l'assenza di immunogenicità [44], [51]. Grazie alla sua natura altamente idrofila, l'HA possiede una straordinaria capacità di ritenzione idrica che garantisce l'idratazione dei tessuti e conferisce alle sue soluzioni proprietà viscoelastiche uniche, agendo come un lubrificante biologico capace di ridurre l'attrito tra le superfici degli organi interni [51], [56].

Nella prevenzione delle aderenze post-operatorie, l'acido ialuronico opera attraverso molteplici meccanismi: agisce come una barriera fisica temporanea che separa le superfici tissutali lese, inibisce la risposta infiammatoria locale e promuove la guarigione stimolando la proliferazione delle cellule mesoteliali del peritoneo. Studi riportano inoltre che l'HA favorisce la dissoluzione fisiologica della fibrina e possiede proprietà antiossidanti e antinfiammatorie intrinseche che contrastano lo stress ossidativo nel sito chirurgico [44], [56]. Per superare i limiti legati alla rapida degradazione in vivo dell'HA, l'attenzione è stata focalizzata sull'impiego dei derivati dell'acido ialuronico modificati idrofobicamente. Ad esempio il sodio oleil ialuronato, modificato idrofobicamente tramite l'innesto di catene di acido oleico (*Figura 10*), garantisce una superiore stabilità enzimatica e

migliori proprietà reologiche, potenziando il tempo di residenza della barriera idratata nel sito chirurgico senza comprometterne l'innata biocompatibilità [52], [59].

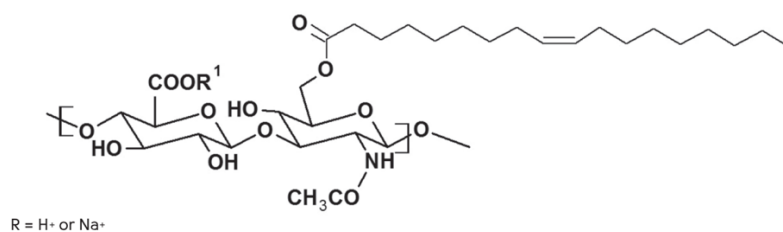


Figura 10: Struttura chimica del sodio oleil ialuronato

II. SCOPO

La formazione di aderenze post-operatorie rappresenta una delle complicanze più frequenti, debilitanti e clinicamente rilevanti a seguito di interventi di chirurgia addomino-pelvica. Dal punto di vista eziopatogenetico, queste connessioni fibrose patologiche originano da un'alterazione dei normali processi fisiologici di riparazione del tessuto peritoneale. L'esigenza di prevenire e trattare efficacemente tale fenomeno configura una vera e propria emergenza medico-chirurgica e socio-economica. Nonostante la rilevanza clinica del problema, i dispositivi medici attualmente disponibili in commercio mostrano una netta inefficienza e forti limiti applicativi. Le soluzioni liquide (basate sul principio dell'idroflottazione) soffrono di una clearance peritoneale troppo rapida, scomparendo dal sito chirurgico prima che la finestra critica della rimesotelizzazione (5-7 giorni) sia conclusa. Al contrario, i film e le membrane solide commerciali presentano un'elevata fragilità allo stato secco e un'eccessiva adesività in ambiente umido, complicando drasticamente la manipolazione intraoperatoria e il posizionamento accurato, specialmente nelle moderne procedure di chirurgia mini-invasiva laparoscopica. Inoltre, le barriere monostrato tradizionali falliscono nel bilanciare requisiti biologici e meccanici tra loro contrastanti, come la necessità di isolare meccanicamente i tessuti contigui e, contemporaneamente, favorire i processi di idratazione e rigenerazione cellulare sul letto della ferita.

Il presente lavoro di tesi si pone come scopo la progettazione, lo sviluppo e la caratterizzazione di un sistema barriera avanzato di tipo bistrato, strutturato secondo un approccio integrato "struttura-funzione" per superare i limiti della monoterapia passiva tradizionale. Il sistema bistrato è stato progettato per esplicitare una sinergia d'azione chimico-fisica e biologica sul microambiente peritoneale lesionato. Nello specifico, il dispositivo è costituito da due strati accoppiati: un film poroso e una matrice fibrosa elettrofilata. Il film, caratterizzato da una porosità strutturale controllata, agisce come barriera meccanica all'ancoraggio cellulare e all'adesione tra organi contigui, garantendo al contempo il libero scambio di gas, fluidi e sostanze nutritive essenziali per supportare i

processi biologici di rigenerazione tissutale. La matrice fibrosa, invece, è progettata per mimare la matrice extracellulare (ECM), favorire la rimesotelizzazione e fungere da piattaforma per il rilascio localizzato di un principio attivo ad attività antibatterica (norfloxacin).

Per raggiungere tale obiettivo, il disegno sperimentale e il processo di produzione del sistema bistrato si sono articolati in tre fasi sequenziali distinte:

- Preparazione e caratterizzazione dello strato fibroso mediante la tecnica di elettrofilatura per l'allestimento di nanofibre a base di polimeri idrofili naturali, quali destrano in combinazione con chitosano oligosaccaride o condroitin solfato, caricate con norfloxacin. Ha compreso, inoltre, la stabilizzazione strutturale delle matrici mediante un processo di reticolazione termico finalizzato all'attivazione dell'acido citrico, indispensabile per conferire resistenza alla precoce dissoluzione in ambiente acquoso. In questa fase, i due tipi di matrici fibrose ottenute sono stati sottoposti a uno studio comparativo per valutarne le proprietà strutturali e meccaniche.
- Preparazione e caratterizzazione del film polimerico mediante la tecnica del solvent casting. In questa fase sono stati investigati polimeri sintetici idrofobici ad elevata stabilità meccanica e biocompatibilità (PLGA e TPU), valutando l'influenza di agenti plasticizzanti (glicerolo e PEG400) sulle performance meccaniche. La formulazione ottimale a base PLGA è stata infine arricchita mediante l'incorporazione di sodio oleil ialuronato, un derivato idrofobicamente modificato dell'acido ialuronico al fine di incrementarne la persistenza enzimatica e le proprietà biologiche del film nel sito di applicazione.
- Assemblaggio e caratterizzazione del sistema bistrato (fibra e film). Il processo di accoppiamento ha previsto la realizzazione in parallelo di sistemi bistrato allestiti con entrambi i tipi di fibre precedentemente sviluppati (a base di chitosano o di condroitin solfato), al fine di valutarne comparativamente l'efficacia e determinare quale costruito offrisse le

migliori performance complessive. I sistemi bistrato sono stati sottoposti a indagini morfologiche, strutturali e meccaniche. La capacità dei sistemi di promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare sono state preliminarmente verificate *in vitro* utilizzando fibroblasti umani normali del derma.

III. PARTE SPERIMENTALE

1. Materiali

Polimeri

- Acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA): Sigma-Aldrich, batch number 0000457970, lactide:glycolide 50:50, MW 38-54 kDa
- Poliuretano (TPU): Lubrizol, batch number 0102032292, MW 90-300 kDa
- Sodium oleyl hyaluronate DS 5 – 15 % (HA): Contipro a.s., batch number DC-241118, MW 5-20 kDa
- Chitosan Oligomer (CO): HMC+, batch number 212-231024-01, MW 5 kDa
- Chondroitin sulfate sodium bovine (CS): Bioiberica, Batch number 15/0008, MW 14000-26000 Da
- Dextran 500 (DX): Pharmaceutical Quality, batch number DK424, MW 500 kDa

Plasticizzanti e agenti reticolanti

- Polietilenglicole 400 (PEG400): Fluka, batch number 81172, MW 380-420 Da
- Glicerolo: Sigma-Aldrich, MW 92,09 g/mol
- Acido citrico (AC): Sigma-Aldrich, batch number 251275, MW 192,12 g/mol

Principio attivo (API)

- Norfloxacin (NF)

Solventi

- Etil acetato: Carlo Erba reagents, batch number P3B112103C
- Acido acetico glaciale: Carlo Erba reagents, batch number P8E018198F
- Acqua milli-Q

2. Metodi

2.1 Preparazione delle fibre elettrofilate

2.1.1. Allestimento della soluzione polimerica

Il destrano è stato inizialmente testato singolarmente a diverse concentrazioni (30% p/p; 32,5% p/p; 35% p/p; 40% p/p) al fine di individuare la concentrazione di polimero ottimale per ottenere fibre omogenee. Poiché il destrano al 40% p/p in acqua ha fornito i migliori risultati, sono state allestite due differenti miscele polimeriche seguendo il medesimo ordine di aggiunta dei componenti: acido citrico, norfloxacin, condroitin solfato oppure, in alternativa, chitosano oligosaccaride, e infine destrano. Nel prosieguo del lavoro, le due formulazioni saranno indicate rispettivamente come formulazione CO e formulazione CS. La *Tabella 1* riporta la composizione quali-quantitativa delle due formulazioni selezionate.

Tabella 1: Composizione quali-quantitativa delle soluzioni polimeriche CO e CS.

% p/p	Destrano	Chitosano oligosaccaride	Condroitin solfato	Norfloxacin	Acido citrico
CO	40	0,2	-	0,21	2
CS	40	-	0,2	0,21	2

2.1.2 Analisi reologica

La caratterizzazione reologica delle soluzioni polimeriche è stata eseguita mediante l'utilizzo di un reometro rotazionale Modular Compact Rheometer MCR 102 (Anton Paar S.r.l., Italia) (*Figura 11*).

Lo strumento è stato equipaggiato con una geometria di misura piatto-piatto (PP50) del diametro di 50 mm.

Per ciascuna analisi, un'aliquota di campione è stata posizionata sullo statore (piatto inferiore). Successivamente, il rotore (piatto superiore) è stato portato alla quota di lavoro, impostando un'intercapedine (gap) pari a 0,100 mm. Una volta

raggiunto il gap, il campione in eccesso fuoriuscente dalla geometria è stato rimosso (*trimming*). L'analisi è stata eseguita a 25°C, temperatura scelta per simulare le condizioni operative del processo di filatura.



Figura 11: Modular Compact Rheometer MCR 102, Anton Paar S.r.l., Italia; (immagine creata con Biorender)

Il principio di misura si basa sull'applicazione di una forza tangenziale sulla superficie della soluzione polimerica da parte del piatto rotante, la quale genera una velocità di taglio proporzionale alla velocità di rotazione del piatto stesso. La forza resistente opposta dal fluido viene registrata dal trasduttore e convertita in sforzo di taglio. La viscosità dinamica (η) del campione viene quindi calcolata tramite il rapporto tra lo sforzo di taglio (τ) e la velocità di taglio (D):

$$\eta = \frac{\tau}{D}$$

Le curve di viscosità sono state ottenute in un intervallo compreso tra 1 s⁻¹ e 1000 s⁻¹. Al fine di garantire la riproducibilità del dato sperimentale sono state eseguite tre repliche per ogni campione. I risultati sono stati espressi graficamente riportando la viscosità (η) in funzione della velocità di taglio (D) (Figura 12).

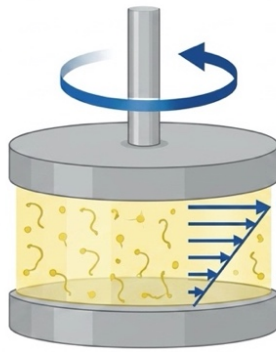


Figura 12: Rappresentazione schematica del profilo di velocità e del gradiente di deformazione (shear rate) del campione sottoposto a sforzo di taglio rotazionale tra piatti paralleli (immagine creata con Biorender).

2.1.3 Electrospinning

Le soluzioni sono state elettrofilate utilizzando l'elettrospinning (STKIT-40, Linari Engineering) (Figura 13).

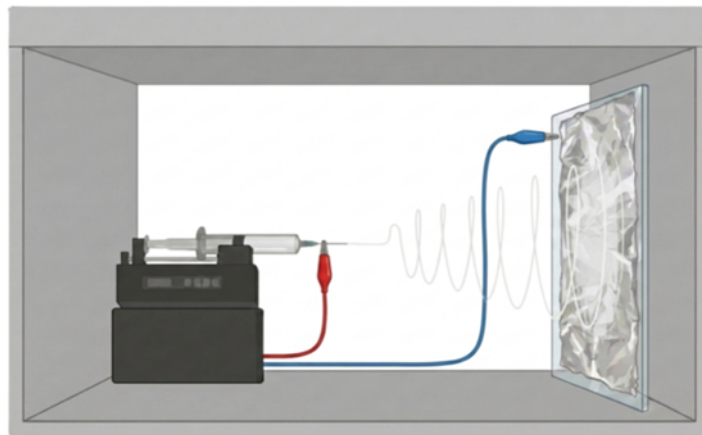


Figura 13: Electrospinning STKIT-40, Linari Engineering (immagine creata con Biorender)

Lo strumento è costituito da un generatore di corrente (5-40 kV), una siringa da 10 ml dotata di ago in acciaio inossidabile da 21G, una pompa volumetrica e un collettore statico in plexiglass rivestito con un foglio di alluminio. I parametri di processo utilizzati per ciascuna formulazione sono riportati nella Tabella 2. Il processo di elettrofilatura è stato condotto a temperatura ambiente (25°C) e un'umidità relativa tra il 25-35%.

Tabella 2: parametri di processo utilizzati per l'elettrofilatura delle soluzioni polimeriche CO e CS.

Campione	Flusso (ml/h)	Voltaggio (kV)	Distanza (cm)
CO	0,1	28	15
CS	0,1	28	15

2.1.4 Crosslinking

Una volta completato il processo di elettrofilatura, le nanofibre sono state rimosse dal foglio di alluminio del collettore. Successivamente sono state sottoposte al processo di crosslinking termico in stufa a 200°C per 2 ore.

2.2 Preparazione dei film polimerici

2.2.1 Allestimento delle soluzioni polimeriche

Le soluzioni polimeriche sono state allestite mantenendo il sistema sotto costante agitazione magnetica a base di poli(acido lattico-co-glicolico) (PLGA) oppure di poliuretano termoplastico (TPU), in versioni con o senza plasticizzanti (glicerolo e/o polietilenglicole 400, PEG400). Come solvente è stato impiegato acetato di etile per le formulazioni a base PLGA e acido acetico glaciale per quelle a base TPU. La *Tabella 3* riporta la composizione quali-quantitativa (% p/p) di tutte le formulazioni esaminate.

Tabella 3: composizione quali-quantitativa delle soluzioni polimeriche.

% p/p	PLGA	Glicerolo	PEG400	Solvente
PLGA	10	-	-	Acetato di etile
PLGA-Glic		0.5	-	
PLGA-PEG		-	0.5	
TPU		-	-	Acido acetico glaciale
TPU-Glic		0.5	-	
TPU-PEG		-	0.5	

Sulla base dei risultati ottenuti, il prototipo PLGA contenente glicerolo è stato selezionato per la fase successiva dello studio e modificata mediante l'incorporazione di sodio oleil ialuronato allo 0,1% p/p.

2.2.2 Processo di solvent casting

I film sono stati ottenuti colando 2 mL di soluzione polimerica all'interno di uno stampo in silicone provvisto di alloggiamenti cilindrici (diametro pari a 3,5 cm, *Figura 14*). Il sistema è stato mantenuto sotto cappa aspirante overnight per favorire l'evaporazione della fase solvente. In seguito alla completa evaporazione di quest'ultima, i film sono stati rimossi dallo stampo in silicone.



Figura 14: Rappresentazione schematica di uno stampo multi-pozzetto in silicone utilizzato per la tecnica di casting di soluzioni polimeriche (immagine creata con Biorender).

2.3 Test di degradazione

Per valutare la degradazione dei campioni nel tempo, circa 10 mg di campione sono stati inseriti in provette Eppendorf contenenti 1 mL di acqua Milli-Q. Le provette sono state quindi incubate a 37 °C in un bagno termostato per intervalli di tempo prestabiliti (24, 48 e 96 ore). Alla scadenza di ogni intervallo, i campioni sono stati centrifugati a 10.000 rpm per 10 minuti per far depositare sul fondo la parte solida residua. Dopo aver rimosso il surnatante, i campioni sono stati lasciati asciugare sotto cappa fino a totale evaporazione dell'acqua. Per determinare il peso secco finale, i campioni sono stati monitorati attraverso pesate successive nel tempo. Il valore finale è stato registrato solo quando due pesate successive hanno

mostrato lo stesso identico valore, confermando la completa asciugatura del materiale.

2.4 Sistema bistrato

2.4.1 Metodologia di assemblaggio del sistema composito

Il sistema composito è stato allestito impiegando uno stampo in silicone del diametro di 1,5 cm. Sul fondo dello stampo è stata posizionata la matrice fibrosa, preventivamente tagliata rispettando le dimensioni esatte della base. Previa pressatura per assicurarne l'adesione al fondo, sono stati aggiunti 0,65 ml di soluzione filmante, prestando attenzione a evitare il sollevamento della fibra sottostante. Il sistema è stato infine mantenuto sotto cappa aspirante overnight per consentire l'evaporazione del solvente.

2.5 Caratterizzazione

2.5.1 SEM

L'analisi della morfologia superficiale delle nanofibre, dei film polimerici e del sistema bistrato è stata eseguita mediante microscopia elettronica a scansione (SEM), utilizzando uno strumento Thermo Scientific Phenom Pure (*Figura 15*). Questa tecnica si basa sull'impiego di un fascio di elettroni primari focalizzati che, impattando sulla superficie del campione in condizioni di alto vuoto, interagisce con gli atomi del materiale. Tale interazione genera l'emissione di elettroni secondari che, raccolti da un apposito rivelatore, vengono convertiti in immagini ad alta risoluzione in bianco e nero.

Per garantire la stabilità del fascio ed evitare l'interazione degli elettroni con le molecole di gas atmosferici, l'analisi richiede che la camera del campione sia mantenuta in condizioni di vuoto spinto. I campioni prima di essere sottoposti all'analisi devono essere resi conduttivi. Essi sono stati resi conduttivi mediante deposizione termica da fase vapore (*sputtering*) di un sottile strato d'oro, impiegando un dispositivo Luxor Au sputter coater. Le immagini sono state

acquisite ad alto voltaggio, in condizioni di alto vuoto e a temperatura ambiente, impostando differenti livelli di ingrandimento: 1000x, 3600x e 6000x.



Figura 15: Phenom ParticleX Steel Desktop SEM (immagine creata con Biorender).

2.5.2 Analisi dimensionale

La determinazione del diametro medio delle nanofibre è stata effettuata mediante l'analisi digitale delle micrografie SEM, utilizzando il software di elaborazione analitica ImageJ. Per ciascuna formulazione, le immagini sono state preventivamente calibrate convertendo la distanza in pixel nella corrispondente unità di misura metrica (μm), prendendo come riferimento la barra di scala (*scale bar*) impressa dal microscopio. Successivamente, per garantire la significatività statistica del dato, sono stati misurati in modo randomizzato 30 diametri di fibra per ogni formulazione esaminata. Le valutazioni sono state condotte sia sui campioni appena filati (pre-crosslinking) sia sui corrispondenti campioni sottoposti a trattamento di reticolazione (post-crosslinking), al fine di quantificare l'eventuale variazione morfologica indotta dal processo.

2.5.3 AFM

La morfologia e la profilometria dei film polimerici sono state valutate mediante microscopia a forza atomica (AFM, Tosca 200, Anton Paar, Austria). Il principio di funzionamento dell'AFM si basa sulla misura delle forze interatomiche

(attrattive o repulsive) che agiscono tra una sonda microscopica affilata, posta all'estremità di un cantilever flessibile, e la superficie del campione.

Le misure sono state effettuate con modalità di tapping mode utilizzando un cantilever in silicio (cantilever AP-ARROW-NCR, Silicon SPM-Sensor, Al-coating; thickness: 4.6 μm , Length: 160 μm , width: 45 μm , resonance frequency: 285 kHz, force constant: 42 N/m; Anton Paar, Austria). In questa configurazione, il cantilever viene fatto oscillare vicino alla sua frequenza di risonanza, sfiorando ("picchiettando") la superficie in modo intermittente; le variazioni nell'ampiezza di oscillazione, indotte dalle variazioni topografiche del substrato, vengono tracciate da un sistema laser per ricostruire un'immagine tridimensionale ad altissima risoluzione.

2.5.4 FT-IR

Gli spettri infrarossi delle nanofibre, sia reticolate che non reticolate, sono stati registrati mediante FT-IR, Spectrum BX, Perkin Elmer (*Figura 16*).

La spettroscopia FT-IR è stata utilizzata per identificare e caratterizzare i composti chimici all'interno delle nanofibre, al fine di dimostrare la formazione di legami che confermino la formazione del crosslinking, prima e dopo il processo di reticolazione. Lo strumento è dotato di un sistema ottico che copre l'intervallo 7800-350 cm^{-1} con una risoluzione inferiore a $<1 \text{ cm}^{-1}$ e può operare in modalità rapporto, singolo raggio (*single-beam*) e interferogramma. La calibrazione è stata eseguita prima di iniziare l'analisi, effettuando la scansione del fondo (*background*) in modalità singolo raggio.

Tutti i campioni sono stati successivamente posizionati nell'apposito alloggiamento e analizzati in modalità trasmissione, nell'intervallo di frequenza 4000-400 cm^{-1} con una risoluzione di 1 cm^{-1} . Tutti i comandi, l'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono stati gestiti tramite il software Spectrum su un computer collegato allo strumento.



Figura 16: FT-IR Spectrum BX, Perkin Elmer (immagine creata con Biorender).

2.6 Proprietà meccaniche

2.6.1 Prove di trazione

La caratterizzazione delle proprietà meccaniche delle nanofibre e dei film polimerici è stata eseguita mediante TA.XT plus Texture Analyzer (ENCO, Spinea, Italia). Lo strumento è equipaggiato con un sistema di afferraggio A/TG costituito da due morsetti con facce zigrinate (35 x 35 cm), serrati tramite apposite viti; il morsetto inferiore è fisso, mentre quello superiore è mobile per consentire l'applicazione del carico di trazione. Le prove di trazione sono state condotte utilizzando una cella di carico da 5 kg.

I campioni sono stati preventivamente tagliati ne seguente modo:

- Fibre elettrofilate: sezioni rettangolari da 2 x 1 cm (area esposta tra i morsetti: 1 x 1 cm)
- Film polimerici: sezioni rettangolari 3 x 0,5 cm (area esposta tra i morsetti: 1 x 0,5).

Prima di procedere con la prova, lo spessore di ciascun campione è stato misurato attraverso un calibro elettronico ORION 31170201. Successivamente, i campioni sono stati posizionati tra i morsetti rispettando le aree esposte sopra citate.

La gestione dello strumento, l'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono state effettuate tramite il software dedicato Exponent. A seguito della calibrazione del sistema, i parametri sperimentali di trazione sono stati impostati come segue:

- Velocità di pre-test: 0,5 mm/sec

- Velocità di test: 0,5 mm/sec
- Velocità di post-test: 0,5 mm/sec
- Forza di trigger: 1 mN
- Distanza: 20 mm

All'avvio del test, il morsetto superiore si sposta verticalmente verso l'alto, esercitando una sollecitazione di trazione sul campione fino al raggiungimento del punto di rottura. Il software elabora i dati registrati generando curve forza-distanza, in cui sull'asse delle ascisse (x) viene riportato lo spostamento del morsetto (espresso in mm) e sull'asse delle ordinate (y) la forza resistente applicata sul campione (espressa in mN). La forza applicata aumenta progressivamente all'aumentare dello spostamento del morsetto, fino a raggiungere un valore massimo in corrispondenza del quale si verifica la rottura definitiva del campione in esame. I risultati sono stati successivamente rielaborati ed espressi in termini di forza massima alla rottura, elongation e modulo di Young.

2.6.2 DMA

Le proprietà viscoelastiche dei sistemi compositi sono state valutate mediante Analisi Meccanico-Dinamica (DMA), al fine di determinare il modulo elastico o conservativo (G') e il modulo viscoso o dissipativo (G'') in funzione della frequenza di sollecitazione. Sull'apparecchiatura è stata montata una cella a immersione, configurazione ottimale per simulare fedelmente le condizioni fisiologiche d'impiego e valutare il comportamento meccanico delle matrici nello stato idratato. I campioni sono stati alloggiati all'interno della cella e immersi in acqua e mantenuti alla temperatura costante di 37°C per l'intera durata dell'analisi. Le geometrie di misura sono state sottoposte a una rampa di frequenza (*frequency sweep*) impostata nell'intervallo tra 0,1 Hz e 10 Hz. Le prove sono state eseguite all'interno della regione di viscoelasticità lineare del materiale, precedentemente individuata tramite test preliminari di ampiezza (*strain sweep*), applicando un valore di deformazione controllata costante per garantire una risposta strutturale non distruttiva.

2.7 Studio di bioadesione

Le proprietà bioadesive del sistema composito sono state caratterizzate su entrambi i lati, investigando sia la componente fibrosa sia il film. I test sono stati condotti utilizzando il TA.XT plus Texture Analyzer, equipaggiato con una sonda cilindrica piana e una cella specifica per prove di adesione (*Figura 17*).

Per simulare l'interazione con gli organi e i tessuti della cavità addominale, è stata impiegata una membrana modello. Per la preparazione quest'ultima si è proceduto con la preparazione di una soluzione a pH 9 (NaOH 1 M) contenente 5 % di Gelatin 185 bloom, 8 % di Natrosol 250 e 0,2 % di glicerolo in acqua (55°C) che è stata miscelata sotto agitazione con 2 ml di dispersione di Prolipid 141 (2 mL in etanolo 96% a 60°C). Successivamente sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione di formaldeide per favorire la reticolazione. Infine, la soluzione è stata posizionata all'interno di uno stampo, al fine di determinarne essiccamento. Il substrato essiccato è stato quindi tagliato in modo da ottenere dischi di sezione circolare con $\varnothing = 10$ mm e fissato all'interno di un supporto dedicato. Al fine di mimare le condizioni fisiologiche *in vivo*, il supporto è stato posto su piastra termostata in modo da mantenere costante la temperatura a 37 °C. I campioni da analizzare sono stati tagliati e ancorati alla superficie della sonda mobile mediante l'utilizzo di un nastro biadesivo. Prima dell'inizio della misurazione, il substrato biologico sul supporto inferiore è stato inumidito per simulare la presenza dei fluidi peritoneali. Una volta avviata l'analisi, la sonda è stata abbassata ad una velocità costante di 1,00 mm/s in modo da portare a contatto il substrato con il sistema bistrato. L'analisi è stata condotta applicando una forza di carico di 2499,7 mN per 180 s. Al termine del tempo di contatto, la sonda è stata sollevata a velocità costante di 2,50 mm/s fino a completo distacco del campione dal substrato. Il profilo di bioadesione è stato registrato e analizzato tramite il software *Exponent*, determinando la forza massima di distacco. Al fine di stabilire un valore di riferimento e quantificare il contributo effettivo dei polimeri all'adesione, i dati ottenuti sono stati confrontati con quelli di un controllo negativo. Per tale controllo

è stato eseguito il medesimo protocollo sperimentale applicando alla sonda un dischetto di carta da filtro inerte al posto del substrato.



Figura 17: configurazione sperimentale del TA.XT plus Texture Analyser equipaggiato con una cella di bioadesione sommersa (immagine creata con Biorender).

2.8 Studi di rilascio in vitro

La quantificazione della norfloxacinina è stata eseguita tramite spettrofotometria UV-Vis (*Figura 18*). Inizialmente, è stata preparata una soluzione stock del farmaco in acqua Milli-Q alla concentrazione di 10 µg/mL. Da quest'ultima, per successive diluizioni, sono stati ottenuti gli standard di calibrazione alle concentrazioni di 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg/mL. Le letture di assorbanza sono state condotte a temperatura ambiente alla lunghezza d'onda di massima assorbanza del farmaco ($\lambda = 277$ nm). La retta di calibrazione è stata elaborata mediante il software Microsoft Excel, interpolando i valori di assorbanza (asse delle ordinate) in funzione delle rispettive concentrazioni (asse delle ascisse) per ricavare l'equazione della retta e il coefficiente di correlazione lineare (R^2).

Al fine di determinare la quantità effettiva di norfloxacinina incorporata, campioni 10 mg di nanofibre non crosslinkate sono stati completamente dissolti in un volume noto di acqua Milli-Q. La completa solubilizzazione della matrice polimerica non reticolata ha permesso di liberare interamente il farmaco intrappolato, consentendo di calcolare la percentuale reale di carico (*Loading Efficiency*) rispetto al teorico formulativo.

Per lo studio di cinetica di rilascio, i campioni pesati accuratamente (circa 10 mg) di nanofibre crosslinkate sono stati inseriti in Falcon e immersi in 5 ml di acqua Milli-Q, mantenuti in un bagno termostato alla temperatura di 37 °C per simulare le condizioni fisiologiche. Lo studio è stato protratto per un totale di 336 ore, effettuando campionamenti ad intervalli di tempo prefissati: 6, 24, 48, 96, 120, 168, 216, 288 e 336 ore.

A ciascun tempo di prelievo, un'aliquota di 2 mL di mezzo di rilascio è stata rimossa dalla Falcon e trasferita in una cuvetta per la lettura spettrofotometrica a 277 nm. Per mantenere la condizione di volume costante, l'aliquota prelevata è stata immediatamente reintegrata con 2 mL di acqua Milli-Q mantenuta a 37 °C.

Per eliminare il contributo dei componenti polimerici della matrice all'assorbanza, il valore misurato per il campione bianco, costituito dalla corrispondente matrice non caricata con norfloxacin ma di identica composizione, è stato sottratto dall'assorbanza del campione contenente il farmaco in corrispondenza di ciascun tempo di analisi. L'assorbanza corretta così ottenuta è stata quindi convertita in concentrazione mediante l'equazione della retta di calibrazione precedentemente determinata.

A causa del continuo reintegro del mezzo con solvente fresco, la progressiva diluizione del sistema è stata corretta applicando un'equazione per il calcolo del rilascio cumulativo.

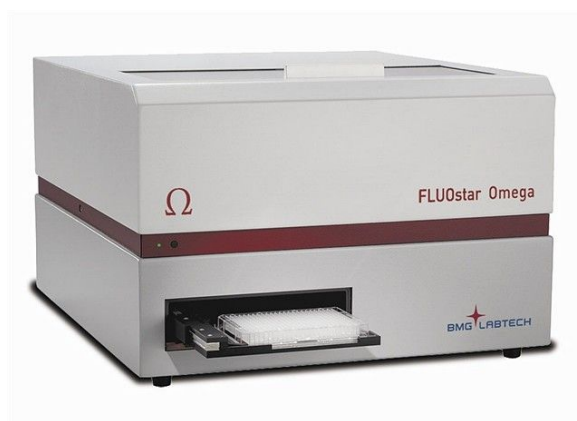


Figura 18: Spettrofotometro di micropiastre FLUOstar® Omega, BMG Labtech (immagine creata con Biorender).

2.9 Test in vitro su fibroblasti

I campioni sono stati testati preliminarmente in vitro su una linea cellulare di fibroblasti di derma umano (NHDF), al fine di valutarne eventuali effetti citotossici e la capacità di fungere da supporti tridimensionali per la crescita cellulare.

2.9.1 Coltura di fibroblasti del derma umano

La coltura dei fibroblasti è stata condotta in flask di polistirene (Cellstar® tissue culture flasks, Grainer Bio-One, Italia) in terreno di coltura completo (CM), costituito da DMEM, addizionato del 10% v/v di FBS, precedentemente inattivato in bagno termostato a 56 °C per 30 minuti, e dell'1% di una soluzione a base di penicillina/streptomicina/amfotericina 100X. Le cellule in coltura sono state mantenute in incubatore (CO₂ Incubator, PBI International, Italia) a 37 °C, con umidità relativa pari al 95%, in presenza del 5% di CO₂. La morfologia e la crescita delle cellule sono state valutate giornalmente mediante osservazione al microscopio a ottica inversa. Quando le cellule occupano l'intera superficie di crescita disponibile, si parla di coltura confluenta. A confluenza, la crescita si arresta (inibizione da contatto) e le cellule devono essere staccate dal fondo plastico e trasferite in altre flasks.

2.9.2 Tripsinizzazione e conta delle cellule

La tripsinizzazione è un'operazione eseguita ogni volta che le cellule ricoprono circa l'80% della superficie della flask ed ha lo scopo di determinare distacco delle cellule tra loro e dal supporto di coltura. Accertati la confluenza e lo stato delle cellule, il terreno di coltura è stato rimosso e il monostrato cellulare lavato con PBS. Terminato il lavaggio, il PBS è stato rimosso e una soluzione di tripsina-EDTA è stata aggiunta nella flask, a contatto con le cellule. La tripsina è un enzima proteolitico, in grado di degradare le proteine della matrice che promuovono l'adesione cellulare, mentre l'EDTA è un composto in grado di chelare gli ioni Ca²⁺ e Mg²⁺, anch'essi indispensabili nei processi di adesione. Al fine di

promuovere l'innesco del processo proteolitico, la flask è stata posta in incubatore, a 37 °C, per 5 minuti, al termine dei quali le cellule ora in sospensione sono state addizionate di terreno completo (in quantità doppia rispetto al volume di tripsina-EDTA impiegato) in modo da bloccare l'attività enzimatica. La sospensione cellulare è stata trasferita in una provetta, quindi centrifugata per 5 minuti a 1500 rpm mediante centrifuga Sorvall TC6 (Sorvall Products, USA). Terminata la centrifugazione, il surnatante contenente la tripsina è stato aspirato, le cellule sono state risospese in terreno di coltura e contate.

2.9.3 Test di proliferazione cellulare

Dopo sterilizzazione con UV per 30 minuti, ciascuno scaffold (diametro 5 mm, spessore 0,2 mm) è stato posizionato in piastra da 48 pozzetti. I fibroblasti sono stati seminati sugli scaffold a una densità di 5×10^4 cellule/pozzetto. Dopo 3 e 6 giorni di contatto, il mezzo è stato rimosso ed è stata aggiunta in ogni pozzetto una soluzione di Alamar Blue al 10% v/v (Thermo Fisher Scientific, Italia). Dopo 3 ore di incubazione al buio a 37 °C, la soluzione di Alamar Blue è stata trasferita su una nuova piastra per la lettura. Il mezzo di coltura è stato quindi reintegrato in ciascun pozzetto e le colture riportate in incubazione. L'intensità di fluorescenza (FI) è stata misurata con un lettore di micropiastre impostando $\lambda_{ex} = 540$ nm e $\lambda_{em} = 590$ nm; la vitalità cellulare è risultata direttamente correlata alla FI.

2.9.4 Morfologia cellulare

La morfologia cellulare dopo 6 giorni di interazione con gli scaffold è stata analizzata mediante microscopia confocale a scansione laser. Nello specifico, le cellule sono state fissate con glutaraldeide al 4% v/v in PBS; successivamente il nucleo è stato colorato con Hoechst 33258 (blu, Sigma-Aldrich, Milano, Italia; 150 μ L/campione a 0,5 μ g/mL in PBS, tempo di contatto 10 min) e il citoscheletro con FITC Atto 488-falloidina (verde, Sigma-Aldrich, Milan, Italia; 200 μ L a 20 μ g/mL in PBS, tempo di contatto 45 min). Le immagini sono state acquisite con un sistema Leica CLSM (TCS SP2, Leica Microsystems, Buccinasco, MI, Italia) impostando

$\lambda_{ex} = 346 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$ per l'Hoechst 33258 e $\lambda_{ex} = 501 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 523 \text{ nm}$ per la falloidina FITC.

Tali campioni sono stati inoltre visualizzati mediante SEM. I sistemi sono stati disidratati in soluzioni crescenti di etanolo e infine metallizzati con 5 nm di oro prima dell'osservazione.

IV.DISCUSSIONE E RISULTATI

1. Sviluppo e caratterizzazione delle fibre elettrofilate

1.1 Studio preformativo

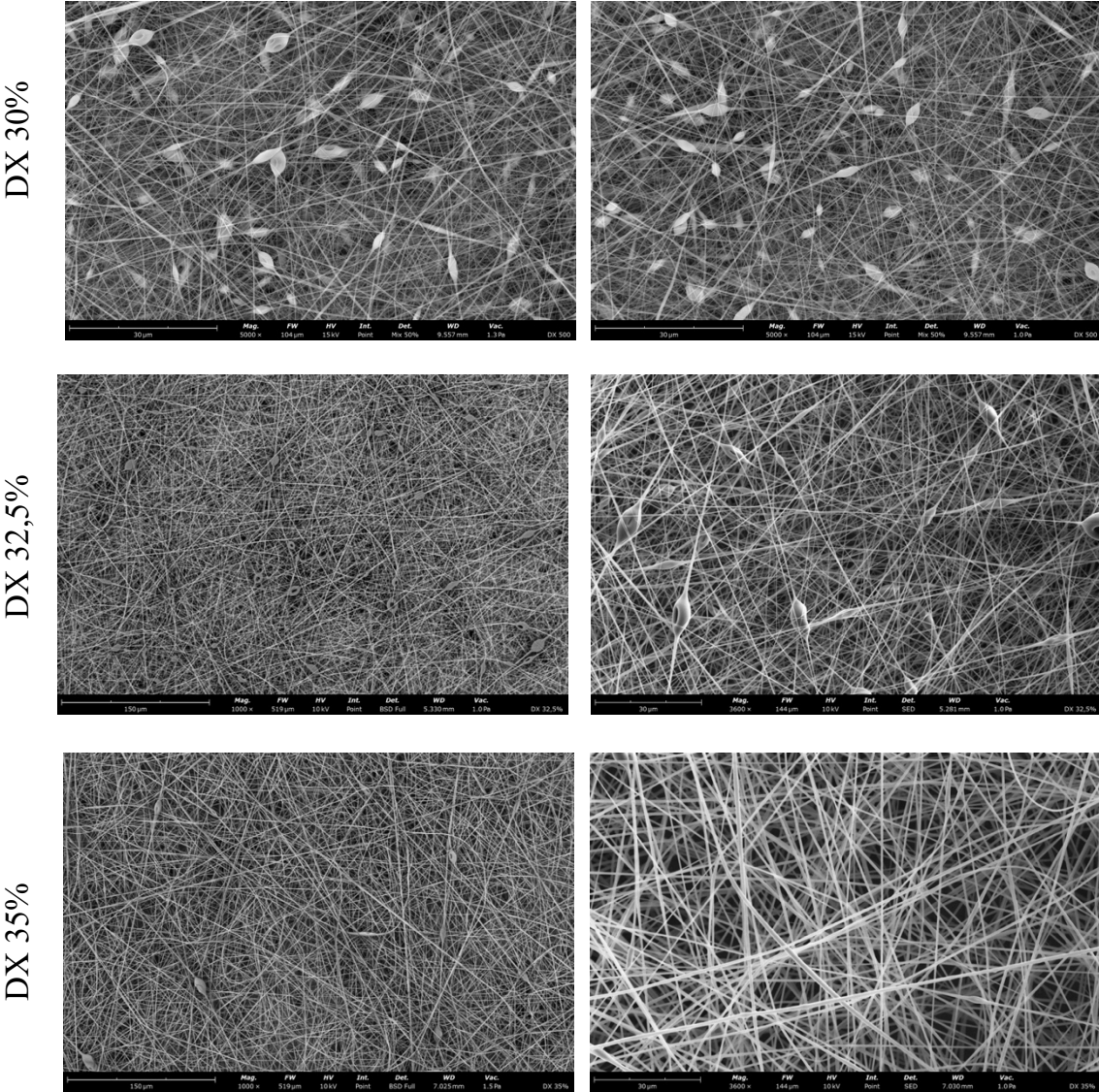
Lo sviluppo delle fibre elettrofilate è stato preceduto da uno studio preformativo finalizzato all'individuazione della concentrazione ottimale di destrano, necessaria per ottenere una matrice fibrosa omogenea e riproducibile mediante elettrofilatura. A tal fine, sono state preparate soluzioni acquose contenenti concentrazioni crescenti di destrano e sottoposte a elettrofilatura.

Parallelamente, il processo è stato ottimizzato attraverso la modulazione dei parametri operativi, identificando i seguenti come ottimali per la filabilità del solo destrano: distanza ago-collettore di 15 cm, differenza di potenziale di 20 kV e flusso di 0,5 mL/h.

In *Figura 19* sono riportate le micrografie SEM delle fibre elettrofilate ottenute a partire da soluzioni di destrano al 30%, 32,5%, 35% e 40% (p/p). I risultati mostrano che la concentrazione del polimero influenza significativamente la morfologia delle fibre. In particolare, il destrano al 30% ha mostrato una marcata presenza di *beads* distribuiti lungo l'intera matrice. Tale comportamento è attribuibile alla bassa concentrazione polimerica, che non consente il raggiungimento di un adeguato grado di entanglement tra le catene di destrano. Di conseguenza, le forze viscoelastiche della soluzione risultano insufficienti a contrastare la tensione superficiale del getto durante l'elettrofilatura, favorendo la formazione di *beads* anziché di fibre continue.

L'aumento della concentrazione al 32,5% ha determinato una significativa riduzione dei difetti morfologici, mentre il destrano 35% ha dato origine a fibre pressoché uniformi e con una morfologia molto simile a quella osservata alla concentrazione del 40%. Tuttavia, durante l'elettrofilatura, la soluzione di destrano al 35% ha mostrato una bassa stabilità del processo, con frequenti interruzioni del getto e una conseguente bassa resa produttiva, rendendo difficoltosa la riproducibilità della matrice.

La concentrazione di destrano al 40% è risultata pertanto la più idonea, permettendo di ottenere un processo di elettrofilatura riproducibile e una matrice costituita da fibre continue, omogenee e prive di *beads*. Per tali ragioni, questa formulazione è stata selezionata per le successive fasi di sviluppo.



DX 40%

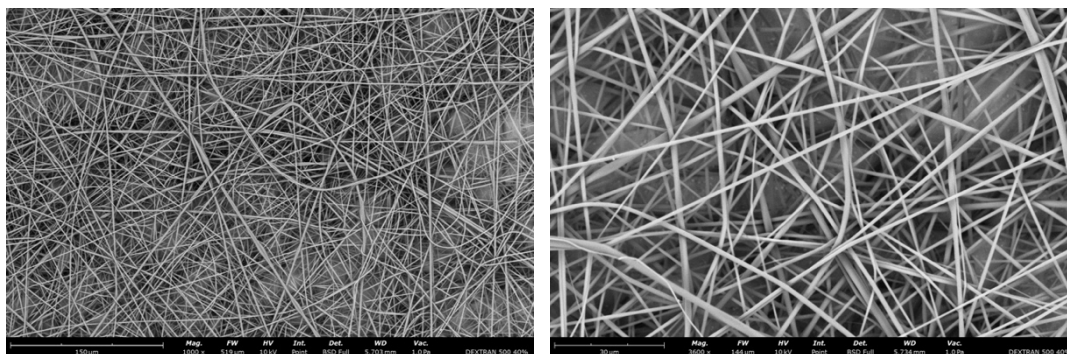


Figura 19: Micrografie SEM di fibre elettrofilate con concentrazione crescente di destrano

A partire dalla soluzione di destrano al 40%, sono stati incorporati acido citrico, utilizzato come agente reticolante, norfloxacin e, alternativamente, chitosano oligosaccaride oppure condroitin solfato, ottenendo le due formulazioni finali, indicate nel seguito come CO e CS, rispettivamente.

1.2 Caratterizzazione reologica delle soluzioni polimeriche

Le due soluzioni polimeriche CO e CS sono state caratterizzate dal punto di vista reologico. In *Figura 20* sono riportate le curve di viscosità, ottenute mediante analisi al reometro rotazionale. Entrambe le formulazioni mostrano un comportamento reologico non newtoniano di tipo pseudoplastico, caratterizzato da una progressiva diminuzione della viscosità all'aumentare della velocità di taglio ($0,1-1000 \text{ s}^{-1}$). Tale comportamento è caratteristico delle soluzioni polimeriche ed è dovuto alla riorganizzazione della loro struttura interna in risposta all'applicazione di uno sforzo di taglio. In condizioni di riposo, le catene polimeriche assumono una conformazione casuale e risultano reciprocamente aggrovigliate, conferendo alla soluzione un'elevata viscosità. All'aumentare dello shear rate, le catene tendono progressivamente a districarsi e ad allinearsi lungo la direzione del flusso, riducendo le interazioni intermolecolari e la resistenza allo scorrimento. Di conseguenza, la viscosità apparente diminuisce progressivamente fino a raggiungere un valore pressoché costante alle più elevate velocità di taglio. Inoltre, è possibile osservare che la formulazione CS presenta valori di viscosità costantemente superiori rispetto alla formulazione CO lungo l'intero intervallo di

shear rate analizzato. Tale differenza può essere principalmente attribuita al maggiore peso molecolare del condroitin solfato (14–36 kDa) rispetto al chitosano oligosaccaride (circa 5 kDa), che favorisce un maggiore grado di entanglement tra le catene polimeriche e una più elevata resistenza al flusso.

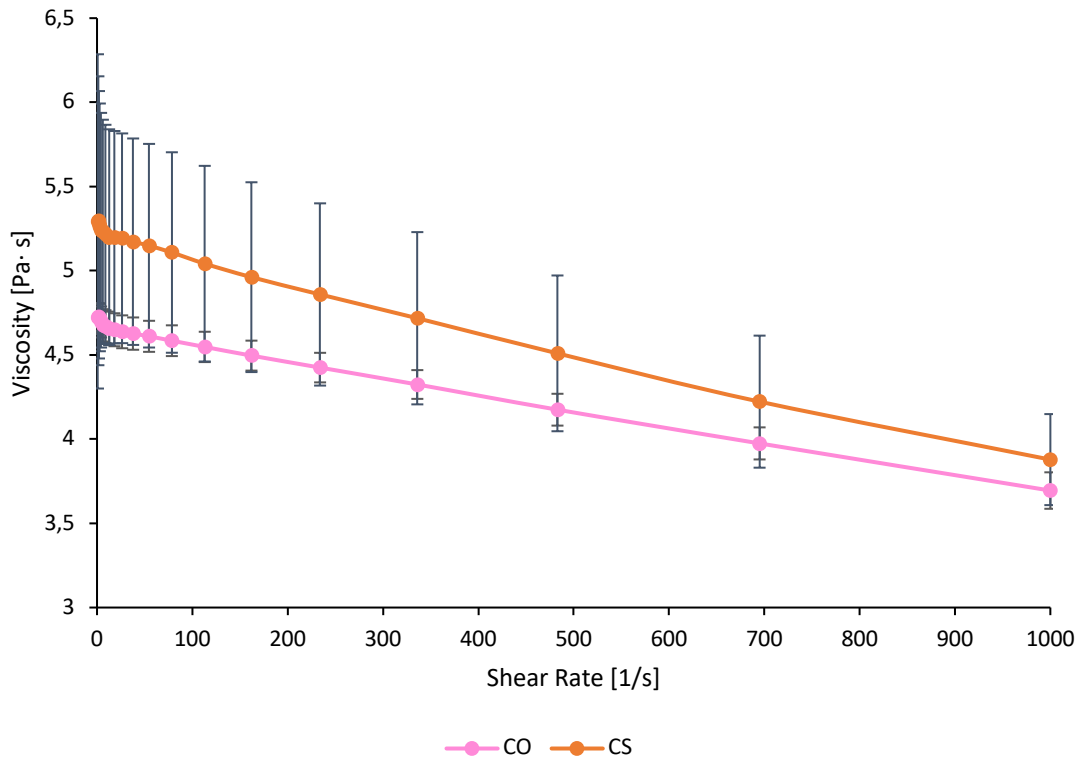
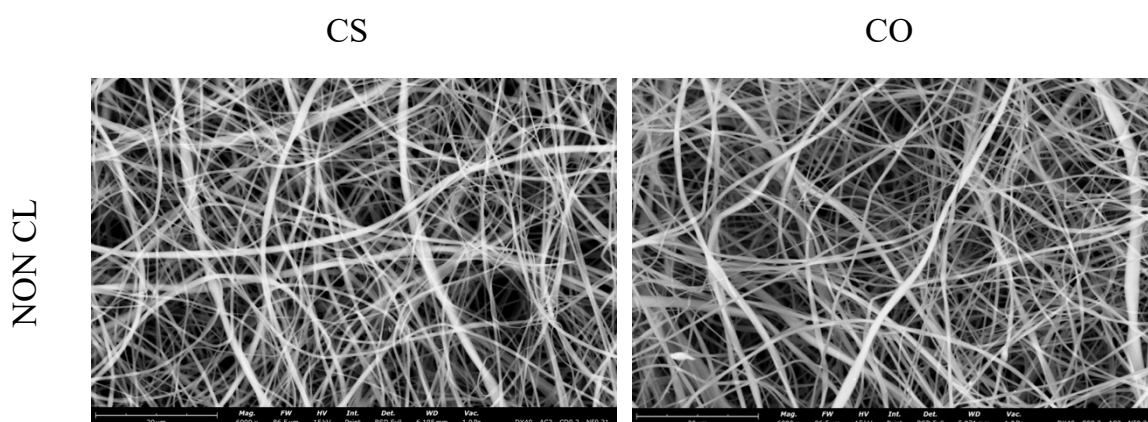


Figura 20: Profili reologici di viscosità in funzione dello shear rate per le soluzioni a base di CO e CS.

1.3 Sviluppo formulativo delle fibre elettrofilate

A seguito della caratterizzazione reologica delle soluzioni di partenza, sono state definite le condizioni operative di elettrofilatura più appropriate per l'ottenimento delle fibre delle formulazioni CO e CS. L'introduzione dei diversi componenti nella formulazione ha infatti richiesto una nuova ottimizzazione dei parametri di processo rispetto al sistema costituito dal solo destrano. Per entrambe le formulazioni sono state individuate come condizioni ottimali una differenza di potenziale applicata di 28 kV e una distanza ago-collettore di 15 cm e un flusso pari a 1 mL/h.

A seguito del processo di elettrofilatura, le fibre sono state sottoposte a processo di reticolazione a 200 °C per 2 ore al fine di consolidare la struttura in ambiente acquoso. In *Figura 21* sono riportate le micrografie SEM delle fibre ottenute immediatamente dopo il processo di elettrofilatura (post-electrospinning, NON CL) e dopo il trattamento di reticolazione (post-crosslinking, CL). L'analisi dimensionale delle fibre è stata effettuata mediante elaborazione delle immagini SEM utilizzando il software ImageJ (*Figura 22*), valutando il diametro medio delle fibre nelle due condizioni sperimentali. Prima del processo di reticolazione, entrambe le formulazioni mostrano una morfologia fibrosa continua e omogenea, caratterizzata dalla presenza di fibre uniformi. L'analisi dimensionale evidenzia una tendenza a un incremento del diametro medio delle fibre CS rispetto a quelle di CO, con valori medi rispettivamente di circa 890 nm e 730 nm. Tuttavia, tale differenza non risulta statisticamente significativa, indicando che l'aggiunta dei due differenti componenti non determina una variazione statisticamente significativa delle dimensioni delle fibre ottenute. A seguito del trattamento di reticolazione, non si osservano variazioni dimensionali significative per nessuna delle due formulazioni. I diametri medi delle fibre rimangono sostanzialmente sovrapponibili a quelli dei sistemi non reticolati, indicando che il trattamento termico selezionato consente di stabilizzare la struttura fibrosa senza comprometterne la morfologia originaria.



CL

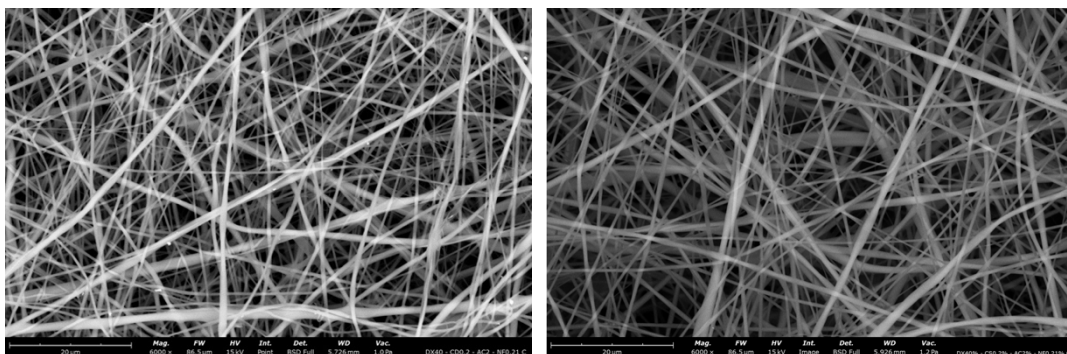


Figura 21: micrografie SEM di fibre elettrofilate di DX 40% p/p, AC 2% p/p, NF 0,21% p/p e CO 0,2% p/p – CS 0,2% p/p, in seguito alla reticolazione; in seguito, alla reticolazione.

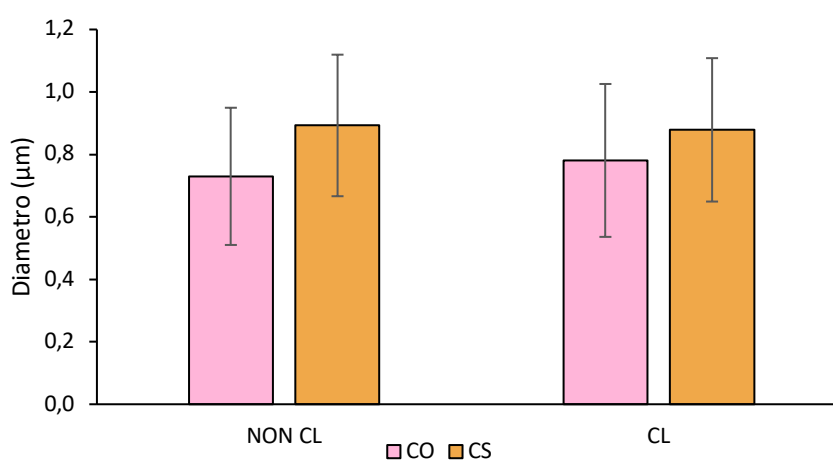


Figura 22: Analisi dimensionale delle fibre elettrofilate (NON CL: diametri delle fibre dopo l'elettrofilatura; CL: diametri delle fibre dopo il processo di reticolazione).

1.4 Swelling index

Al fine di valutare il comportamento delle fibre reticolate in ambiente acquoso, le fibre sono state sottoposte a idratazione e analizzate mediante SEM. In Figura 23 sono riportate le micrografie SEM delle fibre idratate e i relativi valori di *swelling index*, calcolati sulla base della variazione del diametro medio delle fibre prima e dopo l'idratazione.

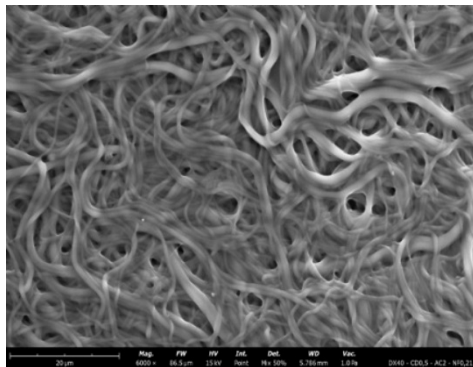
Come mostrato dalle foto SEM, entrambe le fibre sono in grado di mantenere la loro struttura fibrosa, nonostante la formazione di punti di contatto tra le fibre. Inoltre, l'idratazione ha determinato un aumento significativo del diametro medio delle fibre per entrambe le formulazioni, dovuto all'assorbimento di acqua e al conseguente rigonfiamento da parte delle fibre. In particolare, il calcolo dello

swelling index evidenzia un incremento dimensionale pari a circa il 40% per CO e a circa il 12% per CS.

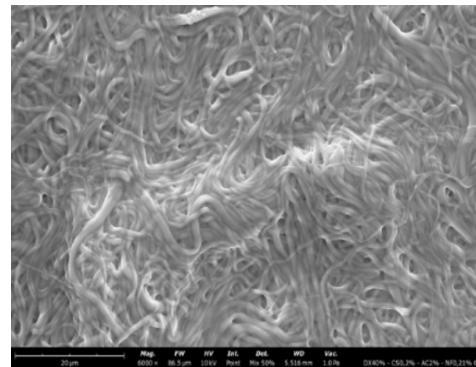
La differente capacità di rigonfiamento osservata per le due fibre può essere ricondotta alla differente composizione della matrice polimerica. La presenza del condroitin solfato, caratterizzato da maggiore peso molecolare e maggiore ingombro sterico rispetto al chitosano oligosaccaride, può contribuire a una minore mobilità delle catene all'interno della matrice e una minore accessibilità dell'acqua all'interno della struttura fibrosa. Inoltre, la presenza di numerosi gruppi funzionali, quali gruppi solfato e carbossilato, può favorire un maggior numero di interazioni intermolecolari con gli altri componenti, contribuendo alla formazione di una matrice più compatta e riducendo ulteriormente la diffusione dell'acqua all'interno della rete.

D'altro canto, CO mostra una maggiore espansione dimensionale dopo idratazione, indicando una maggiore capacità della matrice di assorbire acqua e di modificare la propria organizzazione strutturale in ambiente acquoso.

CO



CS



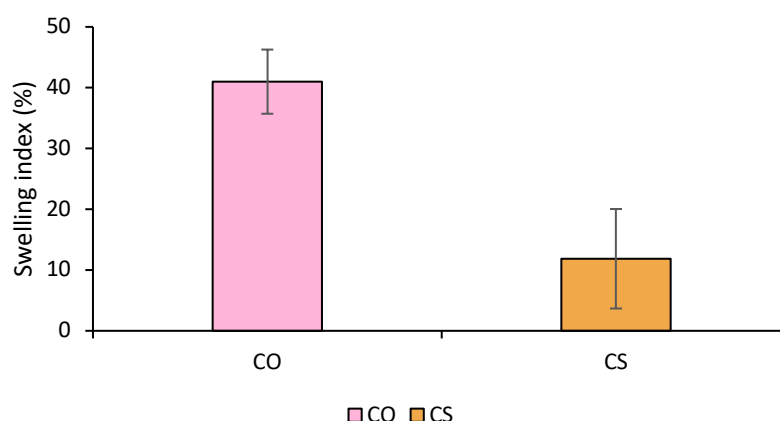


Figura 23: Micrografie SEM delle fibre elettrofilate a seguito di idratazione e indice di rigonfiamento (swelling index) delle matrici fibrose a base di chitosano (CO) e condroitin solfato (CS) dopo idratazione.

1.5 Caratterizzazione chimico-fisica

In Figura 24 e 25 sono riportati gli spettri FTIR delle fibre CO e CS prima della reticolazione (NON CL) e dopo il processo di reticolazione (CL). Per entrambe le formulazioni, la banda larga compresa tra 3200 e 3500 cm^{-1} è attribuibile allo stretching dei gruppi ossidrilici (-OH) presenti nelle componenti polisaccaridiche, mentre le bande nella regione 1200–900 cm^{-1} sono associate alle vibrazioni dei legami C–O e C–O–C tipici della struttura glucidica del destrano.

Inoltre, nel sistema CO, non si osservano variazioni evidenti tra campioni non reticolati e reticolati, né la comparsa di nuove bande chiaramente distinguibili. Anche nel sistema CS il profilo generale viene mantenuto dopo il trattamento termico; tuttavia, rispetto al campione non reticolato, si osserva una variazione dell'intensità relativa delle bande nella regione compresa tra 1700 e 1500 cm^{-1} e della banda associata allo stretching dei gruppi ossidrilici.

La mancata comparsa di nuove bande chiaramente distinguibili è attribuibile alla predominanza dei segnali del destrano, presente in elevata concentrazione nella matrice, che può mascherare eventuali modificazioni associate al processo di reticolazione indotto dall'acido citrico, rendendone difficile l'identificazione mediante FTIR.

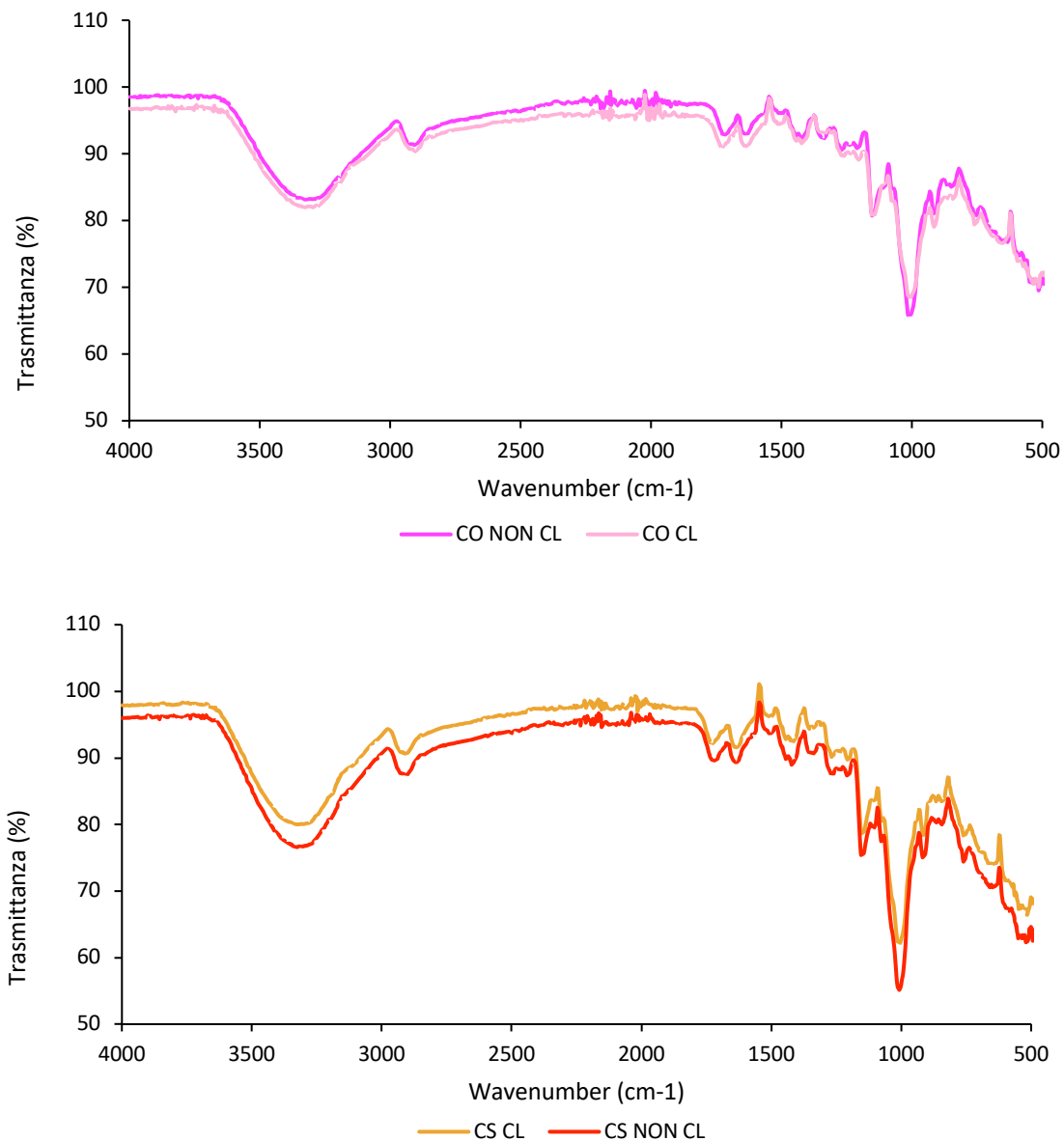


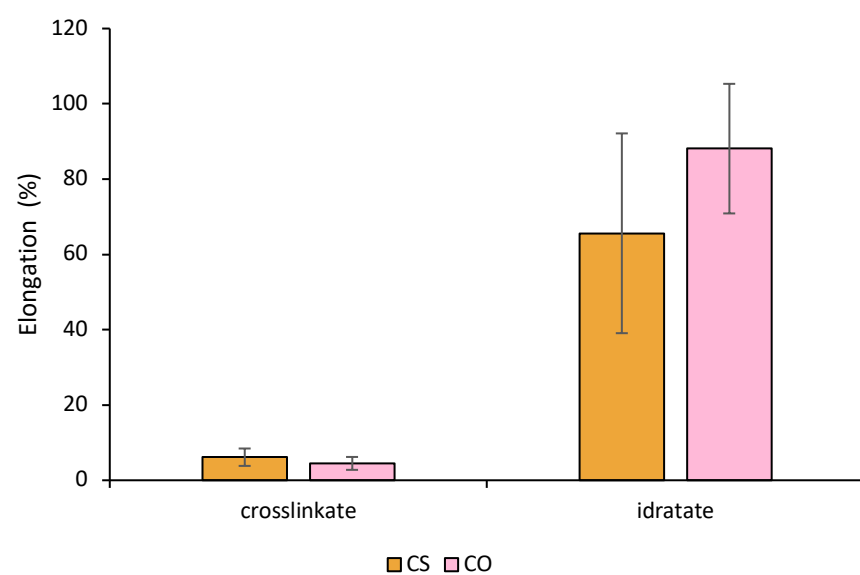
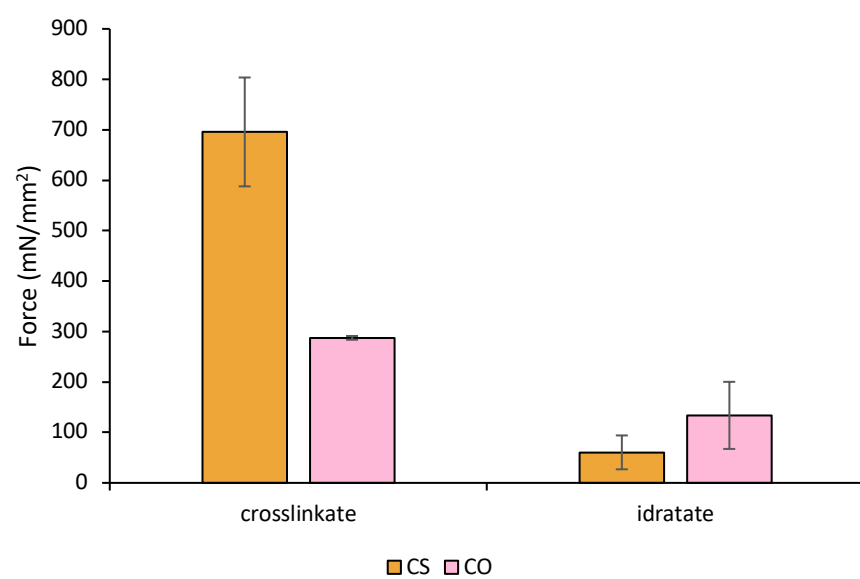
Figura 24-25: Spettri FTIR delle fibre CO e CS a confronto prima (NC) e dopo il processo di reticolazione (C).

1.6 Caratterizzazione meccanica

In Figura 26, 27 e 28 sono riportati i risultati delle prove di trazione eseguite mediante Texture Analyzer sulle fibre CO e CS, analizzate sia allo stato secco sia dopo idratazione, espresse in termini di forza massima alla rottura, elongation e modulo di Young.

Allo stato secco, il confronto tra i due sistemi evidenzia per le fibre CS valori superiori di forza alla rottura e modulo elastico rispetto alle fibre CO. Tale comportamento può essere associato alle caratteristiche del condroitin solfato, caratterizzato da un maggiore peso molecolare rispetto al chitosano oligosaccaride e dalla presenza di numerosi gruppi funzionali in grado di favorire interazioni intermolecolari con gli altri componenti della matrice. Questi fattori possono contribuire alla formazione di una struttura maggiormente organizzata e resistente, determinando una maggiore rigidità delle fibre. Nonostante tali differenze, l'allungamento alla rottura non mostra variazioni statisticamente significative tra le due fibre, indicando una capacità di deformazione comparabile allo stato secco. Dopo idratazione, entrambe le fibre mostrano una marcata variazione delle proprietà meccaniche rispetto allo stato secco, caratterizzata da una significativa riduzione della forza alla rottura e del modulo elastico, associata a un aumento dell'allungamento a rottura. Tale comportamento è coerente con l'assorbimento di acqua da parte della matrice polisaccaridica, che modifica l'organizzazione della rete polimerica. Il confronto tra le due fibre idratate evidenzia un'inversione rispetto al comportamento osservato allo stato secco: le fibre CO presentano valori di forza alla rottura superiori rispetto alle fibre CS, mentre l'elongation e il modulo di Young non variano significativamente tra i due sistemi. Le fibre CS sembrano risentire maggiormente dell'idratazione, evidenziando una riduzione più marcata della resistenza alla rottura.

Dal punto di vista applicativo, entrambe le formulazioni presentano caratteristiche di interesse per lo sviluppo di una barriera anti-aderenziale: la formulazione CS offre una maggiore robustezza durante la manipolazione, mentre la formulazione CO mantiene migliori prestazioni meccaniche dopo idratazione, condizione che meglio rappresenta l'ambiente fisiologico in cui il dispositivo è destinato a essere applicato.



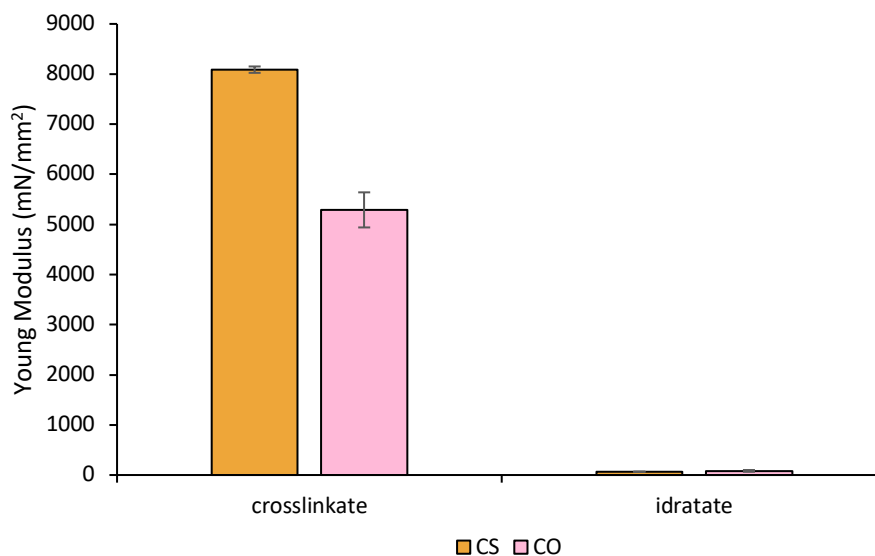


Figure 26-27-28: Caratterizzazione meccanica di trazione: confronto della forza alla rottura, dell'allungamento e del modulo di Young delle fibre elettrofilate.

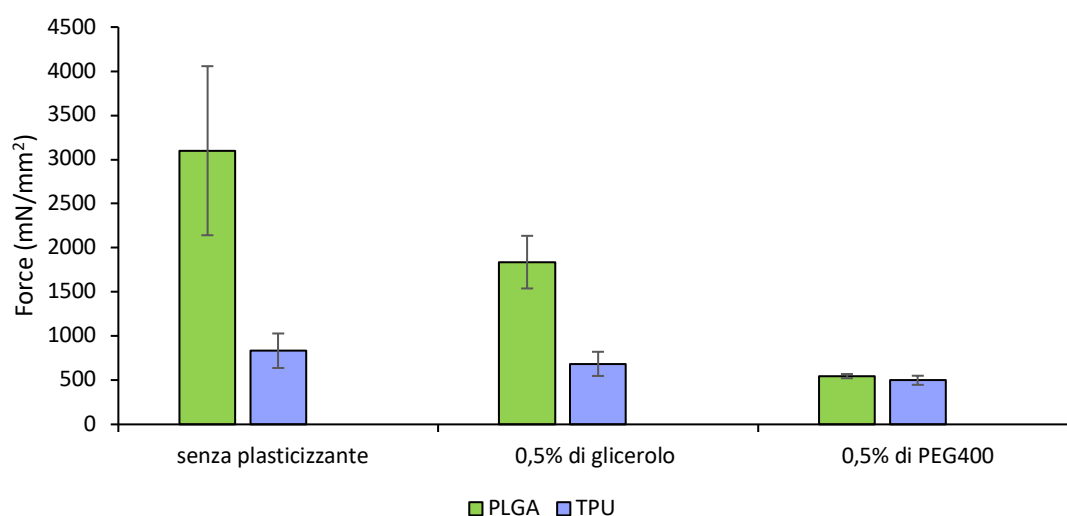
2. Sviluppo e caratterizzazione dei film polimerici

2.1 Studio preformativo e valutazione delle proprietà meccaniche

Sono stati preliminarmente sviluppati film mediante *solvent casting* a base di due differenti polimeri, PLGA e TPU, preparati sia in assenza sia in presenza di agenti plasticizzanti. In particolare, sono stati valutati glicerolo e PEG400, entrambi impiegati alla concentrazione dello 0,5% p/p. Le proprietà meccaniche dei diversi sistemi sono state quindi valutate mediante prove di trazione, al fine di identificare il sistema caratterizzato dal miglior compromesso tra resistenza meccanica, flessibilità e maneggevolezza. In *Figura 29, 30 e 31* sono riportati i risultati delle prove di trazione in termini di forza massima alla rottura, allungamento e modulo di Young, eseguite sui film a base di PLGA e TPU. I profili meccanici dei film privi di plasticizzante evidenziano la differenza strutturale intrinseca tra i due polimeri. Il PLGA mostra un comportamento tipicamente rigido, caratterizzato da valori molto elevati di forza massima alla rottura e di modulo di Young, a fronte di una bassa capacità di allungamento. Al contrario, il TPU si comporta come un materiale spiccatamente elastico, caratterizzato da valori inferiori di forza alla

rottura, modulo elastico e da una maggiore elongazione. L'aggiunta dello 0,5% p/p di plasticizzante determina, per entrambi i sistemi, una riduzione della forza alla rottura e del modulo elastico, rendendo i film più flessibili. Tuttavia, l'effetto risulta differente in funzione del plasticizzante impiegato. In particolare, il PEG400 riduce in modo eccessivo sia il modulo di Young che la forza massima, rendendo il film troppo debole e poco maneggevole, mentre il glicerolo induce una riduzione più contenuta della rigidità, consentendo di preservare un'adequata resistenza meccanica e garantendo allo stesso tempo una migliore flessibilità.

Sulla base di tali risultati, il film costituito da PLGA contenente glicerolo allo 0,5% p/p è stato selezionato come sistema per le successive fasi di sviluppo. A partire da questa formulazione, è stato quindi aggiunto il sodio oleil ialuronato con l'obiettivo di migliorare le proprietà biologiche del film.



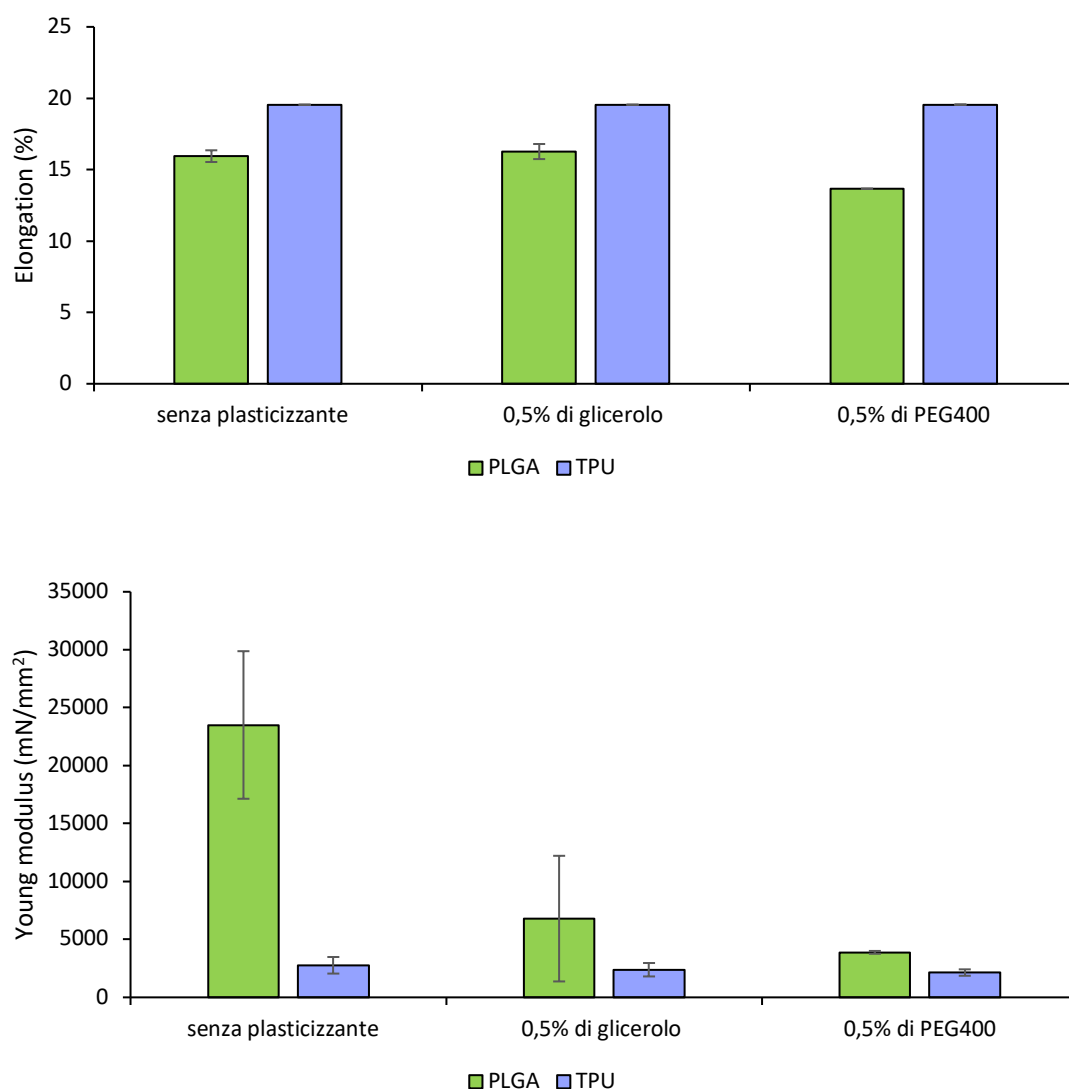


Figure 29-30-31: Caratterizzazione meccanica di trazione: confronto della forza alla rottura, dell'allungamento e del modulo di Young dei film polimerici

2.2 Caratterizzazione morfologica e topografica

La valutazione morfologica e topografica del film selezionato, costituito da PLGA contenente lo 0,5% p/p di glicerolo e lo 0,1% p/p di sodio oleil ialuronato, è stata effettuata tramite microscopia SEM e AFM. La *Figura 32* riporta le micrografie SEM della sezione trasversale e superficiale del film, mentre in *Figura 33* la ricostruzione 3D ottenuta mediante AFM. Le immagini SEM del film rivelano lo sviluppo di un'architettura marcatamente porosa, caratterizzata da cavità ben distribuite e distinte. L'osservazione della sezione trasversale conferma, inoltre,

una struttura interna compatta, all'interno della quale le cavità superficiali appaiono estendersi nei primi strati della matrice, suggerendo la presenza di un'architettura porosa tridimensionale. L'analisi AFM conferma quanto osservato mediante SEM. La ricostruzione tridimensionale della superficie evidenzia una topografia caratterizzata dalla presenza di depressioni corrispondenti alle porosità osservate nelle micrografie SEM. Tale architettura porosa risulta particolarmente interessante per una barriera anti-aderenziale, poiché può favorire gli scambi di fluidi con l'ambiente circostante mantenendo allo stesso tempo l'integrità strutturale del film.

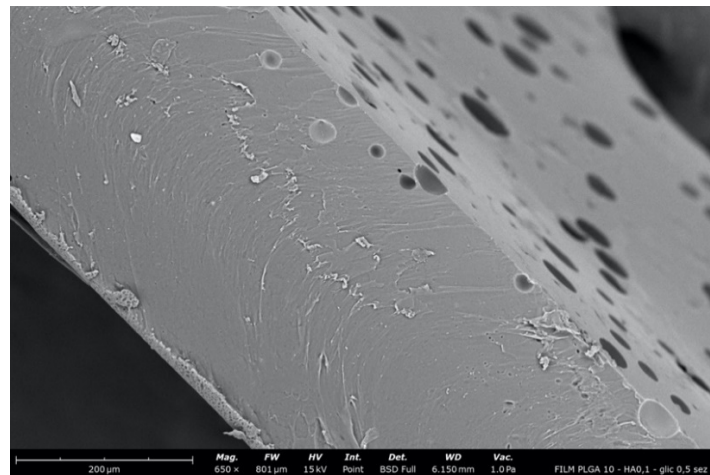


Figura 32: Micrografia SEM della sezione trasversale e superficiale del film polimerico a base di PLGA, glicerolo e sodio oleil ialuronato

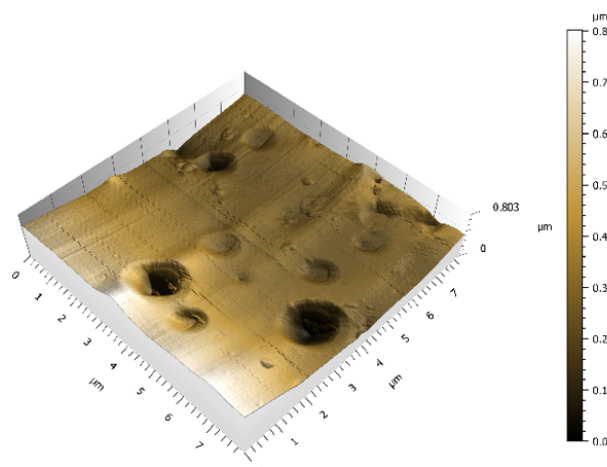


Figura 33: Immagine AFM del film polimerico a base di PLGA, glicerolo e sodio oleil ialuronato

3. Valutazione della degradazione in vitro

Al fine di valutare la stabilità dei sistemi, è stato condotto uno studio di degradazione in ambiente acquoso sulle fibre elettrofilate e sul film polimerico. La *Figura 34* riporta il profilo di degradazione dei sistemi sviluppati, espresso come percentuale di peso residuo in funzione del tempo.

Il film polimerico mostra il profilo di stabilità più elevato, mantenendo circa il 95% del proprio peso iniziale al termine dei 4 giorni. Questo comportamento è coerente con la natura idrofoba del PLGA, il cui processo di degradazione idrolitica richiede tempi significativamente più lunghi. La minima perdita di massa riscontrata (circa il 5%) è presumibilmente da attribuire alla solubilizzazione del sodio oleil ialuronato.

Per quanto riguarda le fibre elettrofilate, si osserva una degradazione più marcata. Il sistema contenente la fibra CO mostra la cinetica di degradazione più rapida, mentre le fibre CS mantengono una maggiore percentuale di peso residuo. Il diverso comportamento delle due fibre risulta coerente con i risultati ottenuti dallo studio di rigonfiamento. In particolare, il maggiore swelling index delle fibre CO favorisce una più rapida penetrazione dell'acqua all'interno della matrice, accelerando la perdita di massa. Al contrario, il minore rigonfiamento osservato per le fibre CS limita la diffusione dell'acqua, contribuendo a rallentarne la degradazione e a garantirne una maggiore stabilità nel tempo.

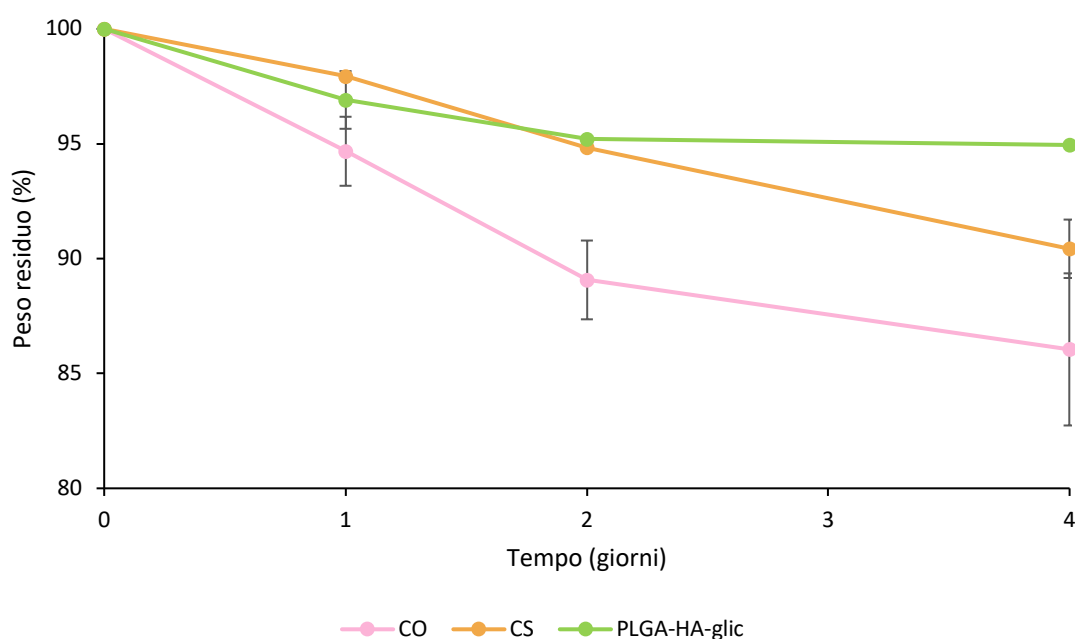


Figura 34: Profili di degradazione in vitro in funzione del tempo per il film polimerico e per le matrici fibrose a base di CO e CS.

4. Assemblaggio e caratterizzazione del sistema bistrato

4.1 Valutazione morfologica

Il film polimerico e la matrice fibrosa sono stati assemblati per ottenere il sistema bistrato finale. La corretta integrazione dei due strati è stata valutata mediante SEM. In *Figura 35 e 36* sono riportate le micrografie della sezione trasversale del dispositivo bistrato.

Le micrografie mettono in evidenza l'efficacia del processo di assemblaggio e la coesione tra i due strati del dispositivo. All'interno della sezione, infatti, si distinguono nettamente le due parti che compongono il sistema: lo strato inferiore, caratterizzato da una struttura compatta, densa e omogenea che corrisponde al film polimerico, e lo strato superiore, contraddistinto dalla tipica rete tridimensionale e porosa formata dalle fibre. Entrambe le componenti mantengono le caratteristiche morfologiche precedentemente osservate nei singoli sistemi, indicando che il processo di assemblaggio non ha compromesso la struttura dei sistemi di partenza.

Inoltre, l'interfaccia tra i due strati mostra una zona di contatto continua e priva di evidenti discontinuità o fenomeni di distacco, supportando l'efficacia del processo di assemblaggio.

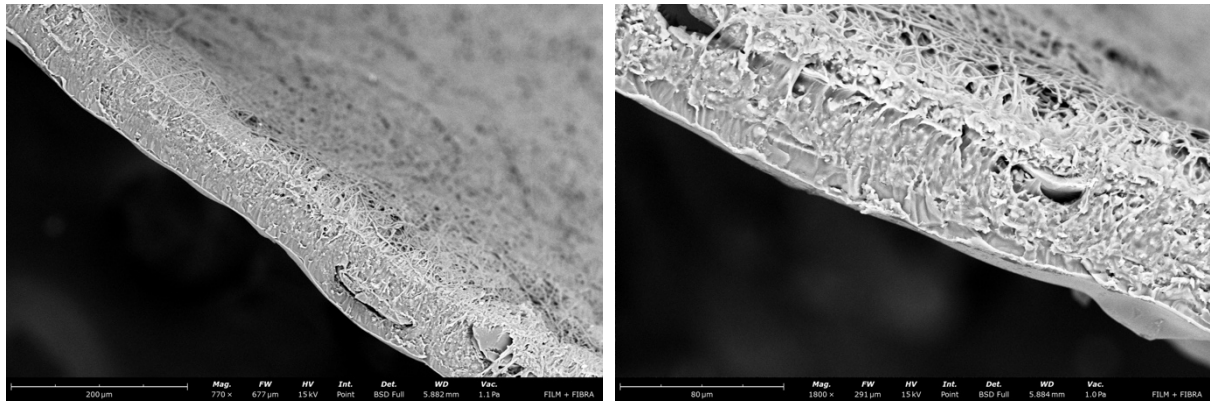


Figura 35-36: Micrografie SEM della sezione del sistema composito

4.2 Valutazione della bioadesione

In *Figura 37* sono riportati i valori di forza massima di distacco ottenuti per le matrici fibrose contenenti chitosano oligosaccaride (CO) e condroitin solfato (CS) e per il film polimerico PLGA-HA-glicerolo, valutati nei confronti di una membrana *ECM-like* e di un supporto inerte costituito da carta da filtro.

Per entrambe le fibre, i valori di adesione ottenuti nei confronti della membrana *ECM-like* risultano significativamente superiori rispetto a quelli misurati utilizzando la carta da filtro, evidenziando una maggiore affinità verso le superfici biologiche.

L'elevata capacità bioadesiva è attribuibile alla struttura tridimensionale delle fibre elettrofilate e alla loro natura idrofila, che favoriscono il contatto con il substrato e l'instaurarsi di interazioni intermolecolari, contribuendo a garantire un efficace ancoraggio del lato fibroso alla superficie lesionata.

Il film polimerico presenta invece una forza di distacco inferiore rispetto alle matrici fibrose. Anche in questo caso, la maggiore interazione osservata nei confronti della membrana *ECM-like* rispetto al supporto inerte suggerisce un

contributo bioadesivo del film, probabilmente dovuto alla presenza del derivato dell'acido ialuronico.

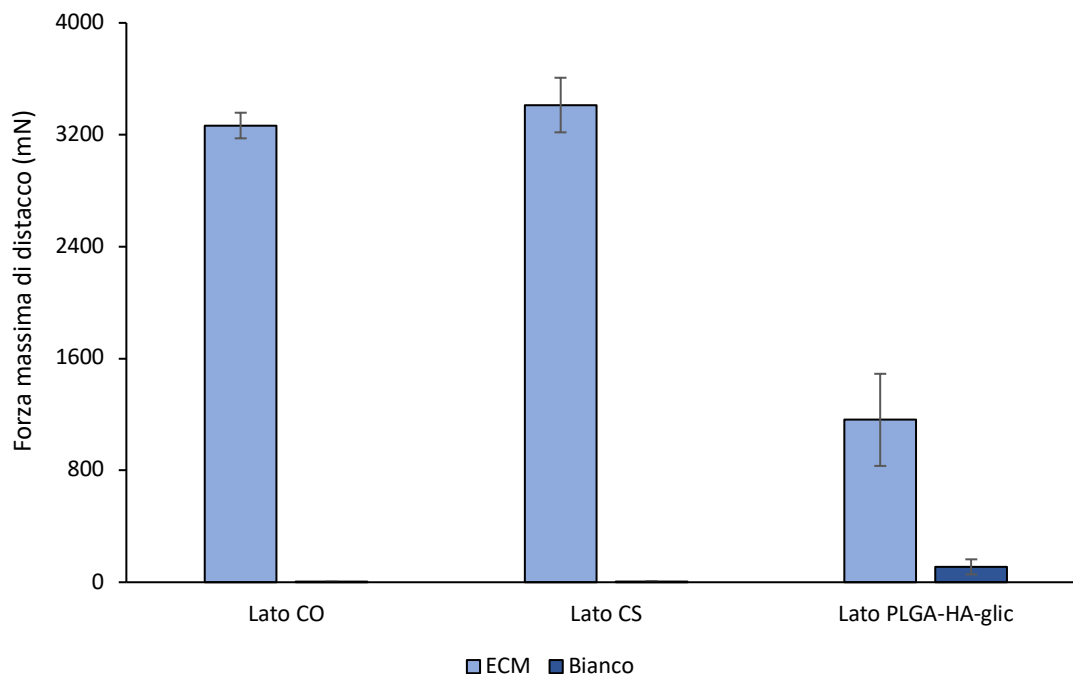


Figura 37: Valutazione delle proprietà bioadesive: confronto della forza massima di distacco (mN) per le matrici fibrose (CO e CS) e per il film polimerico di controllo (PLGA-HA-glic) rispetto ai relativi bianchi.

4.3 Studi di rilascio in vitro

I profili di rilascio percentuale della norfloxacina dai sistemi bistrato contenenti le fibre CO e CS associate ai film polimerici sono riportati in *Figura 38*. Lo studio, condotto fino a una durata complessiva di 336 ore (14 giorni), evidenzia per entrambe le formulazioni un andamento cinetico bidimensionale fortemente speculare. Nello specifico, nelle prime 6 ore si registra una prima fase di rilascio più rapido, pari a circa il 21% per entrambi i sistemi. Successivamente, il rilascio procede in maniera graduale e controllata, fino a raggiungere, al termine dello studio, valori cumulativi compresi tra il 37% e il 38,5%. L'assenza di differenze apprezzabili tra le due formulazioni suggerisce che il comportamento di rilascio sia determinato principalmente dal destrano, componente predominante della matrice polimerica, mentre la sostituzione del co-polimero secondario (chitosano oligosaccaride o condroitin solfato) non influenza in maniera significativa la

cinetica di diffusione della norfloxacin. Il rilascio prolungato osservato conferma inoltre l'efficacia del processo di reticolazione, che stabilizza la struttura della matrice limitandone la dissoluzione in ambiente acquoso e favorendo una diffusione graduale del principio. Ciò suggerisce la capacità del sistema di mantenere una disponibilità locale del farmaco nel periodo post-operatorio, caratteristica potenzialmente vantaggiosa ai fini della prevenzione delle infezioni associate all'intervento chirurgico.

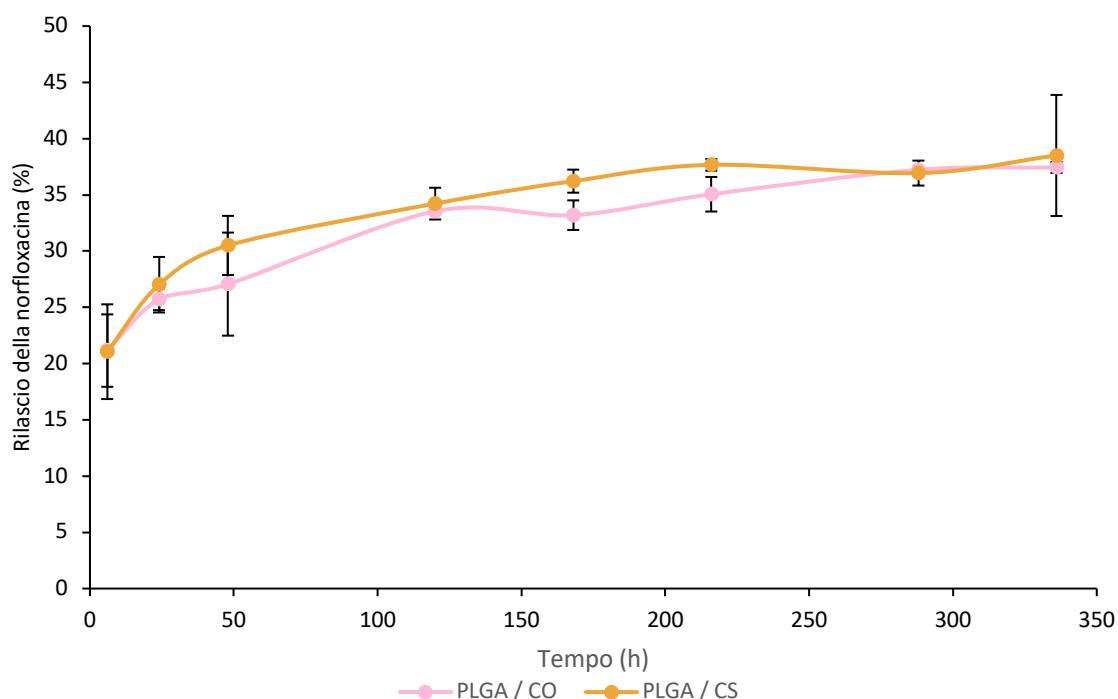


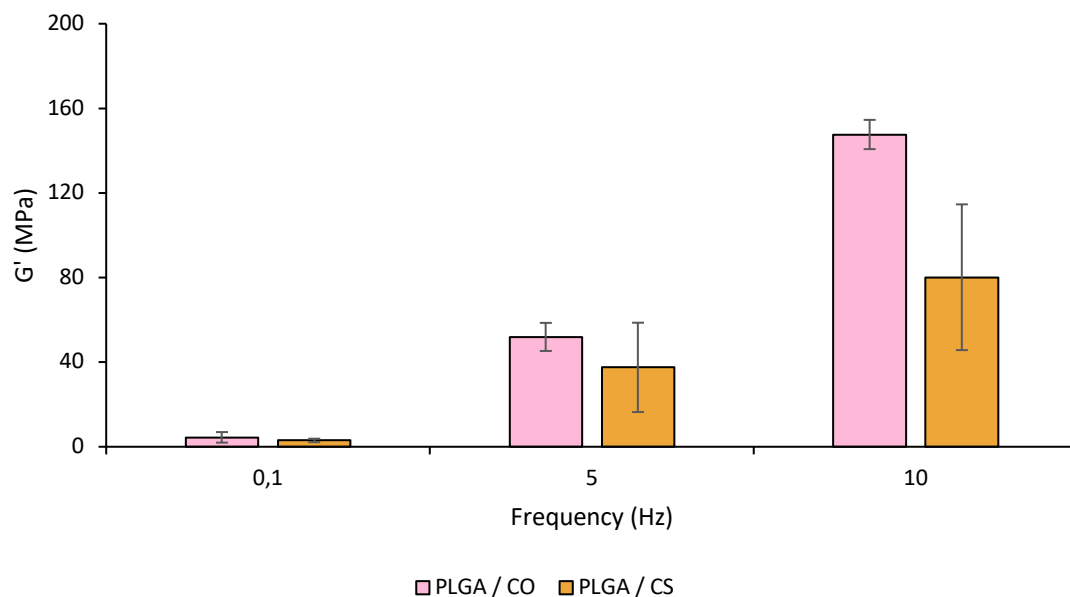
Figura 38: Profilo di rilascio cumulativo percentuale della norfloxacin in funzione del tempo per i sistemi bistrato contenenti le fibre CO e CS associate ai film polimerici.

4.4 Analisi dinamico meccanica

Nelle Figura 39 e 40 sono riportati i profili del modulo elastico (G') e del modulo viscoso (G'') in funzione della frequenza per i sistemi bistrato contenenti le fibre CO e CS associate ai film polimerici. Per entrambe le formulazioni si osserva un incremento del modulo elastico G' all'aumentare della frequenza da 0,1 a 10 Hz, indicando una maggiore risposta elastica del materiale in condizioni di

sollecitazione più rapide. Il confronto tra i due sistemi evidenzia valori di G' superiori per il bistrato contenente CO rispetto a quello contenente CS, suggerendo una maggiore componente elastica e una più elevata capacità della struttura di opporsi alla deformazione.

Per quanto riguarda il modulo viscoso G'' , entrambe le formulazioni mostrano un andamento crescente con la frequenza, ma il sistema contenente CS presenta valori superiori rispetto al sistema CO, riconducibile a una maggiore componente viscosa della matrice. Nel complesso, entrambi i sistemi mostrano un comportamento viscoelastico tipico delle matrici polimeriche, con una componente elastica dominante e una risposta dipendente dalla frequenza applicata. Il sistema bistrato CO evidenzia una maggiore capacità di sostenere deformazioni elastiche, mentre il sistema bistrato CS presenta una maggiore capacità dissipativa, suggerendo un diverso bilanciamento tra rigidità e dissipazione energetica all'interno della struttura bistrato.



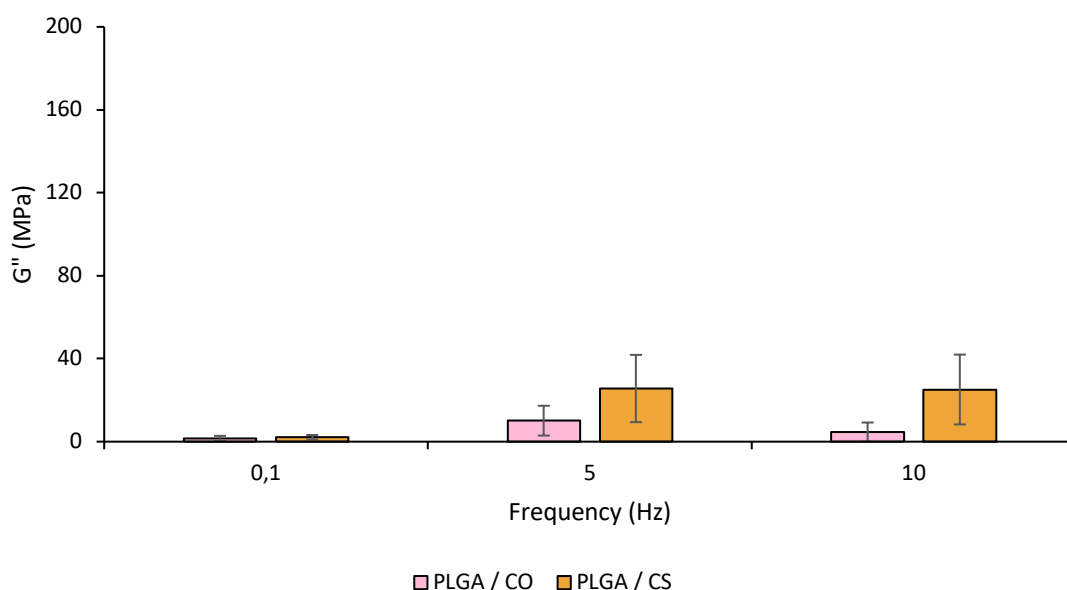


Figura 39-40: Valori del modulo elastico (G') e viscoso (G'') in funzione della frequenza (0,1; 5 e 10 Hz)

4.5 Valutazione preliminare di adesione e proliferazione cellulare

La capacità dei sistemi sviluppati di favorire il processo di rigenerazione è stata valutata preliminarmente utilizzando fibroblasti umani normali del derma come modello cellulare.

In *Figura 41* sono riportati i risultati della proliferazione cellulare ottenuti mediante Alamar Blue a 3 e 6 giorni di crescita dei fibroblasti sui sistemi bistrato. Entrambi i sistemi mostrano un incremento del segnale di fluorescenza (FI) tra il terzo e il sesto giorno, indicando un progressivo aumento del numero di cellule metabolicamente attive e suggerendo la capacità degli scaffold di supportare la proliferazione cellulare nel tempo. Tuttavia, non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i sistemi bistrato contenenti CO e CS, suggerendo che entrambe le formulazioni presentano una capacità comparabile di supportare la crescita cellulare.

A conferma dei risultati ottenuti, al sesto giorno di crescita, la morfologia e l'organizzazione delle cellule adese sui sistemi sono state analizzate mediante SEM e CLSM (*Figura 42*). Le immagini ottenute evidenziano la presenza di numerose cellule distribuite sulla superficie delle fibre, con una morfologia allungata e

caratterizzata dalla presenza di estensioni citoplasmatiche in grado di favorire l'interazione con la struttura fibrosa sottostante.

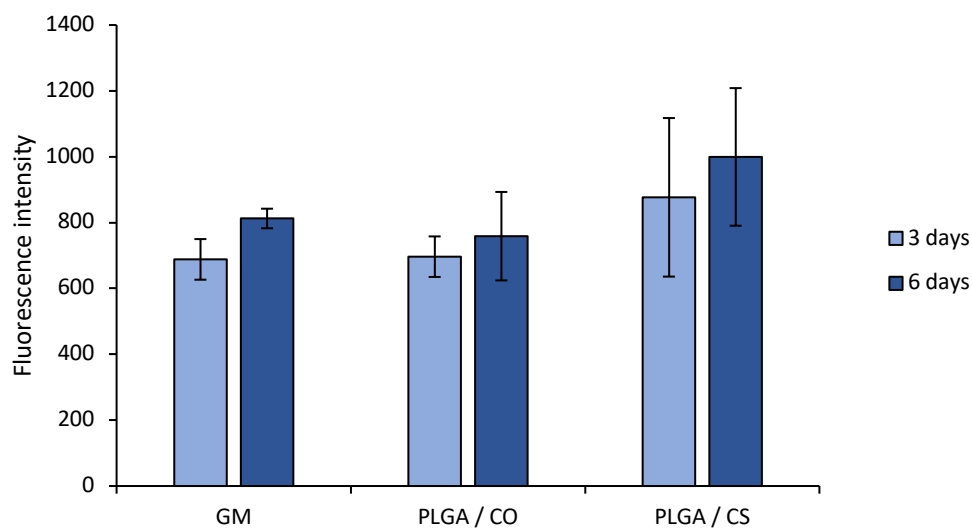
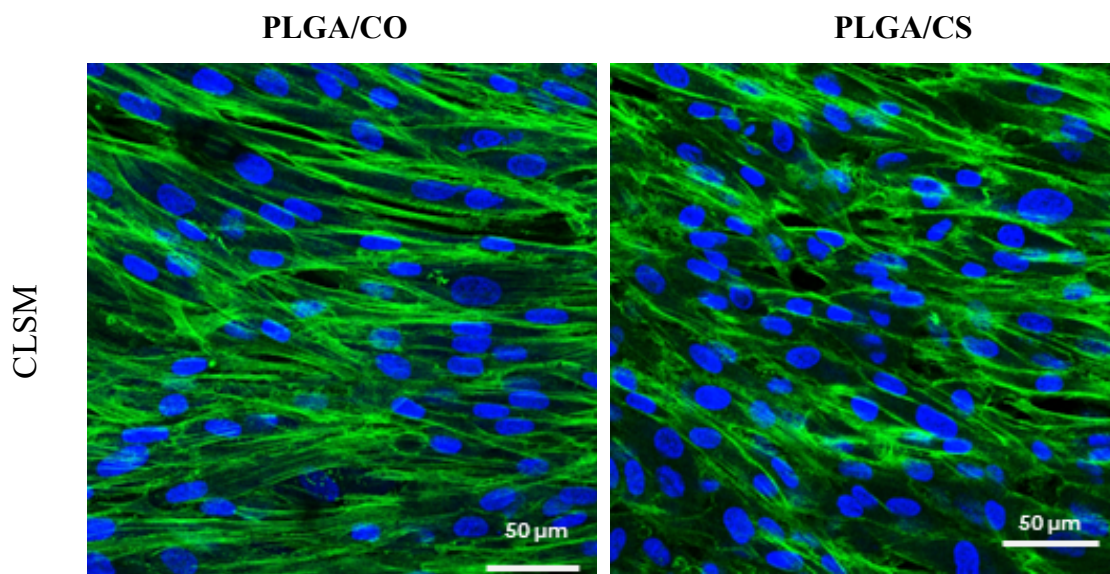


Figura 41: Intensità di fluorescenza dei fibroblasti (NHDF) dopo 3 e 6 giorni di crescita sui sistemi bistrato contenenti CO e CS, a confronto con il controllo in terreno completo (GM) dopo 3 e 6 giorni di coltura.



SEM

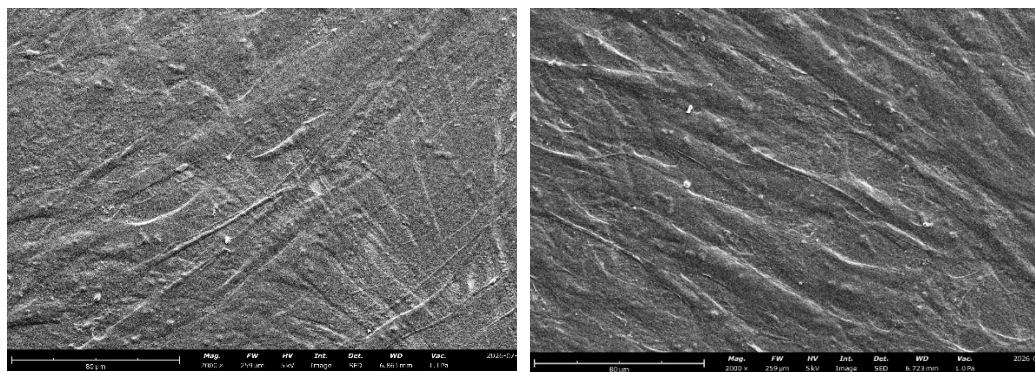


Figura 42: Morfologia e l'organizzazione delle cellule adese sui sistemi bistrato dopo 6 giorni tramite CLSM e SEM

V. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi si è focalizzato sulla progettazione, sullo sviluppo e sulla caratterizzazione chimico-fisica, meccanica e biologica di un sistema barriera bistrato avanzato, ingegnerizzato secondo un approccio integrato "struttura-funzione" per la prevenzione delle aderenze post-operatorie.

La fase preformulativa ha permesso di identificare nel destrano al 40% p/p la concentrazione ottimale per ottenere un processo di elettrofilatura stabile e riproducibile. Successivamente sono state sviluppate due matrici nanofibrose contenenti norfloxacin, acido citrico come agente reticolante e, alternativamente, chitosano oligosaccaride (CO) o condroitin solfato (CS). L'ottimizzazione del processo ha portato alla formazione di fibre omogenee con diametro medio nell'ordine di 800 nm. Il trattamento termico di reticolazione ha migliorato la stabilità delle matrici in ambiente acquoso senza alterarne significativamente morfologia e dimensioni. Le analisi FTIR hanno evidenziato la predominanza dei segnali del destrano, che ha reso meno evidente il contributo dei fenomeni di reticolazione. Le proprietà meccaniche hanno mostrato un comportamento dipendente dallo stato di idratazione: le fibre CS hanno evidenziato maggiore rigidità e resistenza allo stato secco, mentre le fibre CO hanno mantenuto migliori prestazioni meccaniche in condizioni idratate.

Parallelamente, lo sviluppo del film polimerico mediante *solvent casting* ha consentito di identificare il PLGA addizionato con glicerolo come la formulazione più idonea, grazie al miglior compromesso tra resistenza e flessibilità rispetto alle alternative valutate. L'aggiunta di sodio oleil ialuronato ha contribuito a migliorare le proprietà funzionali del film, favorendo sia l'interazione con il microambiente biologico sia le caratteristiche superficiali della matrice. La struttura porosa osservata mediante SEM e AFM consente inoltre lo scambio di fluidi e nutrienti con il tessuto circostante.

Gli studi di stabilità hanno confermato la maggiore resistenza del film polimerico, mentre le matrici fibrose hanno mostrato una degradazione più rapida e coerente con la loro maggiore capacità di idratazione.

L'assemblaggio del sistema bistrato ha portato alla formazione di un'interfaccia continua e coesa tra film e matrice fibrosa. I test di bioadesione hanno evidenziato una maggiore interazione con superfici biologiche per il lato fibroso. Lo studio di rilascio della norfloxacin ha mostrato profili cinetici sovrapponibili per entrambe le formulazioni. Infine, gli studi biologici preliminari su fibroblasti dermici umani hanno confermato la biocompatibilità dei sistemi sviluppati, evidenziando adesione e proliferazione cellulare progressive senza evidenze di citotossicità. Studi futuri saranno indirizzati alla valutazione della risposta immunomodulatoria e della capacità dei sistemi di favorire la rimodellazione del tessuto peritoneale.

VI. BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Chen *et al.*, «Techniques for navigating POSTSURGICAL adhesions: Insights into mechanisms and future directions», *Bioeng. Transl. Med.*, vol. 8, fasc. 6, p. e10565, nov. 2023, doi: 10.1002/btm2.10565.
- [2] S. E. Herrick *et al.*, «Human peritoneal adhesions are highly cellular, innervated, and vascularized», *J. Pathol.*, vol. 192, fasc. 1, pp. 67–72, set. 2000, doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH678>3.0.CO;2-E.
- [3] A. Fatehi Hassanabad, A. N. Zarzycki, K. Jeon, J. F. Deniset, e P. W. M. Fedak, «Post-Operative Adhesions: A Comprehensive Review of Mechanisms», *Biomedicines*, vol. 9, fasc. 8, p. 867, lug. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9080867.
- [4] S. E. Herrick e B. Wilm, «Post-Surgical Peritoneal Scarring and Key Molecular Mechanisms», *Biomolecules*, vol. 11, fasc. 5, p. 692, mag. 2021, doi: 10.3390/biom11050692.
- [5] N. Tabibian, E. Swehli, A. Boyd, A. Umbreen, e J. H. Tabibian, «Abdominal adhesions: A practical review of an often overlooked entity», *Ann. Med. Surg.*, vol. 15, pp. 9–13, mar. 2017, doi: 10.1016/j.amsu.2017.01.021.
- [6] M. Ouaïssi *et al.*, «Post-operative adhesions after digestive surgery: Their incidence and prevention: Review of the literature», *J. Visc. Surg.*, vol. 149, fasc. 2, pp. e104–e114, apr. 2012, doi: 10.1016/j.jviscsurg.2011.11.006.
- [7] J.-J. Duron *et al.*, «Prevalence and risk factors of mortality and morbidity after operation for adhesive postoperative small bowel obstruction», *Am. J. Surg.*, vol. 195, fasc. 6, pp. 726–734, giu. 2008, doi: 10.1016/j.amjsurg.2007.04.019.
- [8] M. Inoue, K. Uchida, C. Miki, e M. Kusunoki, «Efficacy of Seprafilm for reducing reoperative risk in pediatric surgical patients undergoing abdominal surgery», *J. Pediatr. Surg.*, vol. 40, fasc. 8, pp. 1301–1306, ago. 2005, doi: 10.1016/j.jpedsurg.2005.05.015.
- [9] J.-J. Duron *et al.*, «Adhesive Postoperative Small Bowel Obstruction: Incidence and Risk Factors of Recurrence After Surgical Treatment: A

- Multicenter Prospective Study», *Ann. Surg.*, vol. 244, fasc. 5, pp. 750–757, nov. 2006, doi: 10.1097/01.sla.0000225097.60142.68.
- [10] R. J. Morris, T. Nori, A. D. Sandler, e P. Kofinas, «Postoperative Adhesions: Current Research on Mechanisms, Therapeutics and Preventative Measures», *Biomed. Mater. Devices*, vol. 3, fasc. 2, pp. 897–937, set. 2025, doi: 10.1007/s44174-024-00236-7.
- [11] J. O. A. M. Van Baal *et al.*, «The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum», *Tissue Cell*, vol. 49, fasc. 1, pp. 95–105, feb. 2017, doi: 10.1016/j.tice.2016.11.004.
- [12] A. Isaza-Restrepo, J. S. Martin-Saavedra, J. L. Velez-Leal, F. Vargas-Barato, e R. Riveros-Dueñas, «The Peritoneum: Beyond the Tissue – A Review», *Front. Physiol.*, vol. 9, p. 738, giu. 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00738.
- [13] M. Sturm, A. Abazid, e M. Stope, «Tissue adhesion after surgical interventions (Review)», *Exp. Ther. Med.*, vol. 29, fasc. 5, pp. 1–9, mar. 2025, doi: 10.3892/etm.2025.12847.
- [14] M. Yáñez-Mó *et al.*, «Peritoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells», *N Engl J Med*, 2003.
- [15] Y.-T. Chen *et al.*, «Lineage Tracing Reveals Distinctive Fates for Mesothelial Cells and Submesothelial Fibroblasts during Peritoneal Injury», *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 25, fasc. 12, pp. 2847–2858, dic. 2014, doi: 10.1681/ASN.2013101079.
- [16] J. M. Tsai *et al.*, «Surgical adhesions in mice are derived from mesothelial cells and can be targeted by antibodies against mesothelial markers», *Sci. Transl. Med.*, vol. 10, fasc. 469, p. eaan6735, nov. 2018, doi: 10.1126/scitranslmed.aan6735.
- [17] B. Schnüriger, G. Barmparas, B. C. Branco, T. Lustenberger, K. Inaba, e D. Demetriades, «Prevention of postoperative peritoneal adhesions: a review of the literature», *Am. J. Surg.*, vol. 201, fasc. 1, pp. 111–121, gen. 2011, doi: 10.1016/j.amjsurg.2010.02.008.

- [18] A. Rynne-Vidal *et al.*, «Mesothelial-to-mesenchymal transition as a possible therapeutic target in peritoneal metastasis of ovarian cancer», *J. Pathol.*, vol. 242, fasc. 2, pp. 140–151, giu. 2017, doi: 10.1002/path.4889.
- [19] J. Duron, «Postoperative intraperitoneal adhesion pathophysiology», *Colorectal Dis.*, vol. 9, fasc. s2, pp. 14–24, ott. 2007, doi: 10.1111/j.1463-1318.2007.01343.x.
- [20] J. Liao, X. Li, e Y. Fan, «Prevention strategies of postoperative adhesion in soft tissues by applying biomaterials: Based on the mechanisms of occurrence and development of adhesions», *Bioact. Mater.*, vol. 26, pp. 387–412, ago. 2023, doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.02.026.
- [21] V. S. LeBleu *et al.*, «Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis», *Nat. Med.*, vol. 19, fasc. 8, pp. 1047–1053, ago. 2013, doi: 10.1038/nm.3218.
- [22] K. M. Braun e M. P. Diamond, «The biology of adhesion formation in the peritoneal cavity», *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 23, fasc. 6, pp. 336–343, dic. 2014, doi: 10.1053/j.sempedsurg.2014.06.004.
- [23] V. H. González-Quintero e F. E. Cruz-Pachano, «Preventing Adhesions in Obstetric and Gynecologic Surgical Procedures».
- [24] Z.-Y. Liu, R.-F. Li, H.-Y. Qin, e P.-F. Ma, «Postoperative adhesion formation: the role of peritoneal macrophages and targeting therapy», *Front. Immunol.*, vol. 16, p. 1601642, set. 2025, doi: 10.3389/fimmu.2025.1601642.
- [25] D. L. Butler *et al.*, «Functional tissue engineering for tendon repair: A multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation», *J. Orthop. Res.*, vol. 26, fasc. 1, pp. 1–9, gen. 2008, doi: 10.1002/jor.20456.
- [26] L. Yang *et al.*, «Herbal HuoXueTongFu Formula with anti-inflammatory and fibrinolytic activity regulation for the prevention of postoperative peritoneal adhesions», *Front. Immunol.*, vol. 15, p. 1510766, gen. 2025, doi: 10.3389/fimmu.2024.1510766.

- [27] M. Lungu, C. N. Lungu, A. Creteanu, e M. C. Mehedinti, «Integrating Genomics and Molecular Biology in Understanding Peritoneal Adhesion», *Curr. Issues Mol. Biol.*, vol. 47, fasc. 6, p. 475, giu. 2025, doi: 10.3390/cimb47060475.
- [28] T. Jasiński, N. Kozłowska, Ł. Zdrojkowski, A. Bręborowicz, B. Rey, e M. Domino, «The Role of NF-κB in Peritoneal Fibrosis and Adhesion in Humans and Animals: A Systematic Review», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 27, fasc. 5, p. 2199, feb. 2026, doi: 10.3390/ijms27052199.
- [29] R. Wang, T. Guo, e J. Li, «Mechanisms of Peritoneal Mesothelial Cells in Peritoneal Adhesion», *Biomolecules*, vol. 12, fasc. 10, p. 1498, ott. 2022, doi: 10.3390/biom12101498.
- [30] A. J. Mathewson, A. F. Loszko, J. E. Ackerman, N. A. Wilson, e A. E. Loiselle, «Cellular and molecular regulation of fibrotic postoperative abdominal adhesions», *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 330, fasc. 5, pp. C1410–C1426, mag. 2026, doi: 10.1152/ajpcell.00037.2026.
- [31] M. A. Karpov *et al.*, «Molecular and Cellular Mechanisms of Fibrosis of Abdominal Adhesions under the Influence of Oxidized Dextran in the Experiment», *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 179, fasc. 6, pp. 772–777, ott. 2025, doi: 10.1007/s10517-026-06569-1.
- [32] S. E. Mutsaers, K. Birnie, S. Lansley, S. E. Herrick, C.-B. Lim, e C. M. Pr  le, «Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis», *Front. Pharmacol.*, vol. 6, giu. 2015, doi: 10.3389/fphar.2015.00113.
- [33] X. Jin, S. Ren, E. Macarak, e J. Rosenbloom, «Pathobiological mechanisms of peritoneal adhesions: The mesenchymal transition of rat peritoneal mesothelial cells induced by TGF-β1 and IL-6 requires activation of Erk1/2 and Smad2 linker region phosphorylation», *Matrix Biol.*, vol. 51, pp. 55–64, apr. 2016, doi: 10.1016/j.matbio.2016.01.017.
- [34] J. M. Tsai *et al.*, «Neutrophil and monocyte kinetics play critical roles in mouse peritoneal adhesion formation», *Blood Adv.*, vol. 3, fasc. 18, pp. 2713–2721, set. 2019, doi: 10.1182/bloodadvances.2018024026.

- [35] M. Jaworska-Wilczynska, P. Trzaskoma, A. A. Szczepankiewicz, e T. Hryniewiecki, «Pericardium: structure and function in health and disease», *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 54, fasc. 3, pp. 121–125, ott. 2016, doi: 10.5603/FHC.a2016.0014.
- [36] M. Binnebösel, U. Klinge, R. Rosch, K. Junge, P. Lynen-Jansen, e V. Schumpelick, «Morphology, quality, and composition in mature human peritoneal adhesions», *Langenbecks Arch. Surg.*, vol. 393, fasc. 1, pp. 59–66, nov. 2007, doi: 10.1007/s00423-007-0198-x.
- [37] B. Hinz, «The Myofibroblast», vol. 170, fasc. 6, 2007.
- [38] Z. Lin, Z. Liu, Y. Huang, e C. Zhao, «Postoperative abdominal adhesions: pathogenesis and advances in hydrogel-based multimodal prevention strategies», *Acta Biomater.*, vol. 204, pp. 76–108, set. 2025, doi: 10.1016/j.actbio.2025.07.066.
- [39] J. Tang, Z. Xiang, M. T. Bernards, e S. Chen, «Peritoneal adhesions: Occurrence, prevention and experimental models», *Acta Biomater.*, vol. 116, pp. 84–104, ott. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.036.
- [40] T. V. Nechay *et al.*, «Thermal effects of monopolar electrosurgery detected by real-time infrared thermography: an experimental appendectomy study», *BMC Surg.*, vol. 20, fasc. 1, p. 116, dic. 2020, doi: 10.1186/s12893-020-00735-6.
- [41] W. Arung, «Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions», *World J. Gastroenterol.*, vol. 17, fasc. 41, p. 4545, 2011, doi: 10.3748/wjg.v17.i41.4545.
- [42] I.-M. Flutur, D. N. Păduraru, A. Bolocan, A. C. Palcău, D. Ion, e O. Andronic, «Postsurgical Adhesions: Is There Any Prophylactic Strategy Really Working?», *J. Clin. Med.*, vol. 12, fasc. 12, p. 3931, giu. 2023, doi: 10.3390/jcm12123931.
- [43] M. G. Waldron, C. Judge, L. Farina, A. O'Shaughnessy, e M. O'Halloran, «Barrier materials for prevention of surgical adhesions: systematic review», *BJS Open*, vol. 6, fasc. 3, p. zrac075, mag. 2022, doi: 10.1093/bjsopen/zrac075.

- [44] M. Chen *et al.*, «Progress in Polysaccharide-Based Hydrogels for Preventing Postoperative Adhesions: A Review», *Gels*, vol. 11, fasc. 3, p. 188, mar. 2025, doi: 10.3390/gels11030188.
- [45] W.-S. Lee, J. H. Baek, e W. K. Lee, «Direct comparison of Seprafilm® versus Adept® versus no additive for reducing the risk of small-bowel obstruction in colorectal cancer surgery», *Surg. Today*, vol. 43, fasc. 9, pp. 995–1002, set. 2013, doi: 10.1007/s00595-013-0490-z.
- [46] C. B. Brown, A. A. Luciano, D. Martin, E. Peers, A. Scrimgeour, e G. S. diZerega, «Adept (icodextrin 4% solution) reduces adhesions after laparoscopic surgery for adhesiolysis: a double-blind, randomized, controlled study», *Fertil. Steril.*, vol. 88, fasc. 5, pp. 1413–1426, nov. 2007, doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.12.084.
- [47] Q. Zeng, Z. Yu, J. You, e Q. Zhang, «Efficacy and Safety of Seprafilm for Preventing Postoperative Abdominal Adhesion: Systematic Review and Meta-analysis», *World J. Surg.*, vol. 31, fasc. 11, pp. 2125–2131, nov. 2007, doi: 10.1007/s00268-007-9242-9.
- [48] Q. Hu *et al.*, «3D printing/electrospinning of a bilayered composite patch with antibacterial and antiadhesive properties for repairing abdominal wall defects», *J. Mater. Chem. B*, vol. 12, fasc. 39, pp. 10054–10067, 2024, doi: 10.1039/D4TB01543F.
- [49] B. Kheilnezhad e A. Hadjizadeh, «Ibuprofen-Loaded Electrospun PCL/PEG Nanofibrous Membranes for Preventing Postoperative Abdominal Adhesion», *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 5, fasc. 4, pp. 1766–1778, apr. 2022, doi: 10.1021/acsabm.2c00126.
- [50] R. Wang *et al.*, «Fabrication of Multifunctional Sandwich-Structured Electrospun Magnetic Film for Preventing Postoperative Recurrence of Hepatocellular Carcinoma and Abdominal Adhesions», 2025, *SSRN*. doi: 10.2139/ssrn.5162718.
- [51] X. Zhang *et al.*, «Bioinspired bioactive bilayer membrane: A biodegradable adhesive membrane integrating hemostasis, antibacterial, and anti-adhesion

- functions for visceral repair», *Carbohydr. Polym.*, vol. 378, p. 124950, apr. 2026, doi: 10.1016/j.carbpol.2026.124950.
- [52] L. Li *et al.*, «Release of celecoxib from a bi-layer biomimetic tendon sheath to prevent tissue adhesion», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 61, pp. 220–226, apr. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.12.028.
- [53] F. V. Borbolla-Jiménez *et al.*, «Films for Wound Healing Fabricated Using a Solvent Casting Technique», *Pharmaceutics*, vol. 15, fasc. 7, p. 1914, lug. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15071914.
- [54] A. Gholami *et al.*, «Prevention of Postsurgical Abdominal Adhesion Using Electrospun TPU Nanofibers in Rat Model», *BioMed Res. Int.*, vol. 2021, fasc. 1, p. 9977142, gen. 2021, doi: 10.1155/2021/9977142.
- [55] J. Li *et al.*, «Prevention of intra-abdominal adhesion using electrospun PEG/PLGA nanofibrous membranes», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pp. 988–997, set. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.04.017.
- [56] J. Li *et al.*, «Polymer materials for prevention of postoperative adhesion», *Acta Biomater.*, vol. 61, pp. 21–40, ott. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.08.002.
- [57] H. K. Makadia e S. J. Siegel, «Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier», *Polymers*, vol. 3, fasc. 3, pp. 1377–1397, ago. 2011, doi: 10.3390/polym3031377.
- [58] H. Park, S. Baek, H. Kang, e D. Lee, «Biomaterials to Prevent Post-Operative Adhesion», *Materials*, vol. 13, fasc. 14, p. 3056, lug. 2020, doi: 10.3390/ma13143056.
- [59] J. Cai, J. Guo, e S. Wang, «Application of Polymer Hydrogels in the Prevention of Postoperative Adhesion: A Review», *Gels*, vol. 9, fasc. 2, p. 98, gen. 2023, doi: 10.3390/gels9020098.

VII. SITOGRAFIA

<https://www.biorender.com/>

<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/life-science/sigma->

[aldrich?srsltid=AfmBOordxNXl8JvOuXQ15v_VaeECLkHmwf0c-](aldrich?srsltid=AfmBOordxNXl8JvOuXQ15v_VaeECLkHmwf0c-)

<oqrWUJiL5UTh7VI7yY>

<https://chat.figurelabs.ai/>