

Politecnico di Torino

Tesi magistrale di Ingegneria Biomedica



**Politecnico
di Torino**

**Sviluppo e ottimizzazione di processi al plasma a
bassa pressione di biomateriali per potenziale
applicazione nel trattamento del glaucoma**

Relatrice

Prof.ssa Chiara Vitale Brovarone

Co-relatori

Prof.ssa Sonia Lucia Fiorilli

Dr. Jacopo Barberi

Prof. Antonio Fea

Candidata

Francesca Naso

Anno Accademico 2023/2024

*Un ringraziamento particolare va alla relatrice, Prof.ssa Chiara Vitale Brovarone,
ai co-relatori, Prof.ssa Sonia Lucia Fiorilli, Dr. Jacopo Barberi e Prof. Antonio Fea,
per avermi dato la possibilità di approfondire un tema che mi sta molto a cuore,
seguendomi con infinita disponibilità durante tutte le fasi di questo lavoro.*

*Infine, desidero ringraziare i miei genitori
e mia sorella
per aver sempre creduto in me.*

Sommario

LISTA DELLE FIGURE	4
LISTA TABELLE.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUZIONE.....	8
1.1 Il glaucoma.....	8
1.2 Epidemiologia	10
1.3 Anatomia e fisiologia oculare.....	11
1.3.1 Tensione oculare e UA	15
1.4 Classificazione	19
1.4.1 Glaucomi ad angolo aperto.....	19
1.4.2 I glaucomi ad angolo chiuso.....	20
1.4.3 I glaucomi congeniti.....	22
1.5 Diagnosi	22
1.6 Strategie terapeutiche farmacologiche	28
1.7 Chirurgia laser	31
1.8 Chirurgia incisionale	32
1.9 La chirurgia del glaucoma minimamente invasiva (MIGS).....	33
2. Nuovi biomateriali e dispositivi nel trattamento del glaucoma.....	40
2.1 L'elettrospinning.....	41
2.2 Dispositivi elettrofilati per il glaucoma.....	42
2.3 PVDF.....	44
2.4 I siliconi di grado medico.....	45
2.4.1 Il SILPURAN.....	47
2.5 Limiti delle modifiche superficiali tradizionali.....	47
2.6 Trattamenti di modifica superficiale con plasma.....	49
3. MATERIALI E METODI	52
3.1 Preparazione della formulazione a base di PVDF.....	52
3.1.1 Electrospinning delle membrane di PVDF.....	52
3.2 Preparazione dei campioni in elastomero siliconico	54
3.3 Design of Experiment.....	54
3.3.1 DoE dei trattamenti al plasma da effettuare sulle membrane di PVDF.....	57
3.3.2 DoE dei trattamenti al plasma da effettuare sui campioni di SILPURAN	60
3.4 Trattamenti al plasma	62
3.5 Angolo di contatto	64
3.5.1 Misurazione dell'angolo di contatto statico	65
3.5.2 Misurazione del tempo di residenza.....	66

3.6 Caratterizzazione morfologica tramite microscopia a scansione elettronica (SEM).....	66
3.7 Caratterizzazione chimico-fisica	68
3.7.1 Spettroscopia infrarossa FTIR-ATR.....	68
3.7.2 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)	70
3.8 Test meccanici	72
3.9 Test di stabilità a 28 giorni e 3 mesi	73
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	75
4.1. Caratterizzazione morfologica delle membrane di PVDF.....	75
4.2 Trattamenti al plasma sulle membrane di PVDF.....	76
4.4 Caratterizzazione morfologica e chimico-fisica delle membrane sottoposte ai trattamenti ottimizzati.....	92
4.2 Substrati di silicone	96
4.5 Modello del DoE per i trattamenti al plasma sul SILPURAN	97
5. CONCLUSIONI E PROSPETTI FUTURI	103
BIBLIOGRAFIA.....	104

LISTA DELLE FIGURE

Figura 1.0: Schematizzazione dei processi biologici che avvengono tra porzione anteriore e posteriore dell'occhio nel glaucoma. La PIO generata nella porzione anteriore compromette la comunicazione del segnale visivo al cervello a causa del danno provocato alle CGR, situate nella parte posteriore [1].....	10
Figura 1.1: Anatomia dell'occhio [13].....	11
Figura 1.2:Modello di Imbert-Fick confrontato con il modello di Goldmann e Schmidt [28].....	23
Figura 1.3: Contatto prisma-cornea durante misurazione della PIO con GAT (sinistra) e allineamento dei menischi di fluorescerina per effettuare corretta lettura sulla scala graduata (destra) [10]	24
Figura 1.4: Riflessione interna totale della luce che esce dalla cornea ed effetto sull'angolo critico di una goniolente [33]	28
Figura 1.5: impianti Molteno (Molteno Ophthalmic Ltd., Dunedin, New Zealand)[57]	35
Figura 1.6: Impianti Baerveldt (Abbott Medical Optics Inc., Irvine, CA) [57]	35
Figura 1.7: Impianto PAUL(Advanced Ophthalmic Innovations, Singapore, Repubblica di Singapore) [57].....	35
Figura 1.8: Dispositivo Ahmed Glaucoma Valve (a) e Ahmed® ClearPath (b)	36
Figura 1.9: Dispositivi MIGS del canale di Schlemm: iStent® (Glaukos Inc., San Clemente, CA) (a), iStent inject® (b), iStent inject® W (c) e Hydrus® Microstent(d).....	37
Figura 1.10: Dispositivi per MIGS supracoroidali: micro-stent CyPass (Alcon, Fort Worth, Texas, USA) (a), iStent SUPRA (Glaukos Corporation, California, USA) (b), SOLX® gold shunt (SOLX, Inc., Massachusetts, USA) (c), STARflo (iStar Medical, Wavre, Belgium) (d) e MINject (iStar Medical, Wavre, Belgium) (e)[57].....	38
Figura 1.11: Suprachoroidal Bio-tissue Device (IANTREK, White Plains, NY, USA)[58]	39
Figura 1.12: MIGS subcongiuntivali: XEN gel stent (Allergan PLC, Dublin, Ireland) (a) , PRESERFLO MicroShunt (Santen, Osaka, Japan)(b), VisiPlate (Avisi Technologies, Filadelfia, PA, USA)(c) GORE GDI (WL Gore & Associates, Newark, DE, USA)(d)[57]	40
Figura 1.13: Dispositivo EX-PRESS (Alcon Laboratories, Inc., Texas, USA)[59]	40
Figura 2.0: Schema delle forze presenti nel cono di Taylor[61].....	41
Figura 2.1: Unità ripetitiva del PVDF	44
Figura 2.2: piattaforma SpyGlass [74]	46
Figura 2.3: vulcanizzazione del SILPURAN ® 2420 A/B	47
Figura 3.0: Fluidnatek LE-50 (Bionicia) usato per la produzione delle membrane	53
Figura 3.1: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione delle membrane di PVDF	53
Figura 3.2: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione dei campioni di SILPURAN	54
Figura 3.3: rappresentazione dei punti di progettazione per CCC a 2 variabili (a), CCI a 2 variabili (b), CCF a 2 variabili (c), CCC a 3 variabili (d), BBD a 3 variabili (e)[89]	56
Figura 3.4: rappresentazione del modello di tipo CCD utilizzato per stilare la matrice sperimentale [90].....	58
Figura 3.5: impianto al plasma a bassa pressione Femto (Diener electronic GmbH & Co. KG, Germania) usato per questo lavoro di tesi.....	63
Figura 3.6: campioni di PVDF (A) e di Silpuran(B) da trattare al plasma	64
Figura 3.7: schema angolo di contatto e tensioni superficiali [92].....	65
Figura 3.8: Drop Shape Analyzer – DSA100S (KRÜSS, Germania).....	66
Figura 3.9: SEM Phenom XL utilizzato per la caratterizzazione morfologica.....	67
Figura 3.10: strumento FTIR-ATR utilizzato per questo lavoro di tesi.....	70
Figura 3.11: curva sforzo deformazione [99]	72
Figura 3.12: schema di un provino ad osso di cane utilizzato per i test a trazione delle membrane di PVDF	73
Figura 4.0: Immagine al SEM delle membrane di PVDF elettrofilate con fibre allineate non trattate con ingrandimento 5000x e scale bar 10 µm (a sinistra) e distribuzione dei diametri medi (a destra)	76
Figura 4.1: WCA del PVDF pre-trattamento.....	76
Figura 4.2: immagini al SEM a diversi ingrandimenti di membrane che hanno subito ritiro durante il trattamento al plasma con ingrandimento x2000, x5000, x10000e scale bar di 30 µm, 10 µm e 8 µm	77
Figura 4.3: Diagramma dei parametri R2, Q2, MV, Rip	79
Figura 4.4: Diagramma dei coefficienti	80
Figure 4.5: Superfici di risposta	81
Figura 4.6: Immagini SEM delle membrane sottoposte a trattamento 4(A), 7(D), 8 (B), 20 (E), 25(C) e 27 (F) con ingrandimento x2000, x5000, x10000e scale bar di 30 µm, 10 µm e 8 µm.....	83
Figura 4.7: spettri FTIR dei campioni non trattati e di quelli sottoposti ai trattamenti 4,7,8,20,25,27	84

Figura 4.8: Percentuale di fase α , β e γ dei campioni non trattati e di quelli sottoposti ai trattamenti 4,7,8,20,25,2	85
Figure 4.9: Scansione Survey delle membrane di PVDF non trattate (A) e sottoposte al trattamento al plasma 25 (B) e Deconvoluzione dei picchi C1s (C) e F1s (D) del PVDF non trattato e dei picchi C1s (E), F1s (F) e O1s (G) delle membrane sottoposte al trattamento 25	87
Figura 4.10: immagine SEM membrane trattate 150s,45W,O ₂ e 0.5 mbar	89
Figura 4.11: portacampioni diviso in 4 aree per verificare l'influenza della posizione del campione all'interno della camera sul risultato del trattamento. L'area 1 è quella vicina all'ingresso, mentre l'area 4 è quella vicina al fondo della camera.	91
Figura 4.12: Immagini Sem delle membrane non trattate (A), trattate con esp 25 (B), esp 2_30 (C) e 3_0 (D), scale bar 30 μm	93
Figura 4.13: grafico della fase FEA, α , β e γ nei campioni non trattati e trattati con esp 2_30 e 3_0 con i relativi spettri FTIR-ATR	94
Figura 4.14: grafico che confronta dose, fase α , β e γ degli esperimenti 0,4,7,8,20,25,27,2_30,3_0 con i relativi spettri FTIR-ATR	95
Figura 4.15: curve sforzo-deformazione delle membrane di PVDF non trattate (a sinistra) e post trattamento 3_0 (a destra)	96
Figura 4.16: Immagine al SEM campioni di SILPURAN	97
Figura 4.17: grafico che confronta dose e WCA nei trattamenti del DoE sul SILPURAN	98
Figura 4.18: Diagramma dei parametri R2, Q2, MV, Rip modello SILPURAN	98
Figure 4.19: Diagramma dei coefficienti del modello	99
Figure 4.20: Superfici di risposta	99
Figura 4.21: immagini SEM dei campioni di SILPURAN trattati al plasma 180s, 210W, O ₂ e 0,5 mbar (A), 30 s, 210 W, O ₂ e 0,5 mbar (B) e 180s,45W, O ₂ e 0,1 mbar (C), (D) ingrandimento, marker 30 μm A-C e 50 μm per D	100
Figura 4.22: spettri FTIR-ATR dei campioni di silicone non trattato, trattato 180s, 45W, 0.1 mbar, O ₂ , 30s, 210W, 0.5 mbar, O ₂ e 180s, 210W, 0.5 mbar, O ₂	102

LISTA TABELLE

Tabella 3.0: parametri di processo per ESP di membrane in PVDF	54
Tabella 3.1: prima matrice sperimentale codificata per i trattamenti sul PVDF.....	57
Tabella 3.2: Parametri utilizzati in letteratura per i trattamenti al plasma in Ar e O ₂ su PVDF	58
Tabella 3.3: Parametri utilizzati in letteratura per i trattamenti al plasma in Ar e O ₂ su silicone	61
Tabella 3.4: prima matrice sperimentale codificata per i campioni silicone	62
Tabella 4.0: Matrice sperimentale con risposta misurata per ogni trattamento	78
Tabella 4.1: tempo di residenza sui campioni dell'ESP 25 dopo 28 gg.....	85
Tabella 4.2: trattamento ottimizzato	89
Tabella 4.3: Ottimizzazione per il mantenimento delle proprietà meccaniche	90
Tabella 4.4: tempo di residenza sui campioni dell'esperimento 150s,45 W, O ₂ e 0.5 mbar dopo 28 gg	90
Tabella 4.5: Schema dell'ottimizzazione per scale up.....	92
Tabella 4.6: diametri medi delle membrane trattate con esperimento 25, 2_30, 3_00	93
Tabella 4.7: Fasi α , β e γ degli esperimenti 0,4,7,8,20,25,27,2_30,3_0	95
Tabella 4.8: Modulo di Young, elongazione e carico di snervamento delle membrane pre e post trattamento 3_0	96
Tabella 4.9: tempo di residenza sui campioni dell'esperimento 2_30.....	96
Tabella 4.10: Matrice sperimentale con risposta misurata per ogni trattamento	97
Tabella 4.11: distanze medie tra fessurazioni e rugosità dei campioni di SILPURAN trattati al plasma.....	100

ABSTRACT

Il glaucoma è la seconda causa più comune di cecità irreversibile nel mondo. È una neuropatia ottica generalmente caratterizzata da un aumento della pressione intraoculare (PIO). I trattamenti attuali mirano a raggiungere una PIO target per ritardare la degenerazione retinica e la conseguente perdita della vista. Gli interventi di impianto di dispositivi di drenaggio per il glaucoma (DDG) sono l'opzione adottata nei casi in cui abbiano fallito sia la trabeculectomia che la gestione farmacologica. La selezione appropriata dei materiali e la progettazione dei dispositivi sono cruciali per evitare risposte infiammatorie e da corpo estraneo. La chimica del biomateriale, la rugosità superficiale e la topografia possono influenzare la biocompatibilità e modulare i comportamenti cellulari post impianto. I DDG vengono spesso realizzati in silicone nonostante sia noto che una superficie idrofobica può favorire la deposizione di proteine non specifiche e il rigetto da corpo estraneo. Nonostante i recenti sforzi verso lo sviluppo di nuovi biomateriali, il successo a lungo termine dei DDG è limitato a causa dell'incapsulamento fibrotico. Le strategie più comunemente usate per limitare questo problema includono la modifica superficiale degli impianti mediante metodi fisici o chimici o l'integrazione dell'impianto con un innesto chirurgico. L'innesto è spesso realizzato mediante una membrana nanofibrosa che imita la struttura sana della matrice extracellulare, al fine di supportare l'integrazione dei dispositivi, mitigando l'attivazione dei fibroblasti e la risposta di guarigione. Lo scopo di questa tesi è quello ottimizzare trattamenti di modifica superficiale utilizzando plasma in bassa pressione per incrementare la bagnabilità superficiale di biomateriali idonei per impianti chirurgici DDG. In questo lavoro, è stato valutato l'effetto del trattamento al plasma su due diversi tipi di substrati polimerici: membrane elettrofilate di polivinilidene fluoruro e campioni di silicone di grado medico commerciale (SILPURAN). Diversi trattamenti al plasma a bassa pressione con argon e ossigeno sono stati esplorati per modificare le proprietà di bagnabilità superficiale dei materiali selezionati senza influenzarne le caratteristiche massive. Al fine di ottimizzare e massimizzare l'effetto dei parametri del trattamento al plasma (gas, tempo, potenza e pressione operativa) è stato utilizzato un approccio iterativo multivariato basato sul design of experiment. Per valutare le modifiche delle caratteristiche chimico-fisiche e morfologiche indotte dal plasma sono state effettuate misurazioni dell'angolo di contatto, analisi SEM, FTIR-ATR su entrambi i polimeri, pre e post modifica superficiale. Per le membrane di PVDF sono state inoltre eseguite prove a trazione, calcolo della fase elettroattiva, analisi XPS e test di stabilità del trattamento a 28 giorni e 3 mesi. Alla fine del lavoro sono stati ottenuti due trattamenti con O₂: il primo è in grado di produrre nel PVDF una modifica stabile, ripetibile e duratura della bagnabilità con un comportamento superidrofilico, mentre il secondo è capace di indurre delle microfessurazioni e modificare la rugosità superficiale del silicone, anche se l'idrofobicità viene recuperata rapidamente.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il glaucoma

Il termine glaucoma comprende un gruppo eterogeneo di malattie oculari in cui, a causa della compromessa trasduzione biomeccanica tra la camera anteriore e posteriore dell'occhio, si verificano: irrigidimento della rete trabecolare (RT), aumento della produzione e/o ridotto drenaggio dell'umore acqueo (UA), infiammazione retinica, apoptosi di cellule ganglionari retiniche (CGR) e attivazione della microglia, delle cellule di Müller e degli astrociti. I principali fattori di rischio sono: età, pressione intraoculare (PIO) elevata, storia familiare, origine etnica, miopia elevata e malattie vascolari. Le fasi iniziali della malattia sono caratterizzate da perdita della visione periferica (laterale), seguita da una graduale perdita della visione centrale. A causa della progressione lenta ed indolore spesso viene formulata una diagnosi solo in una fase avanzata della patologia e soprattutto dopo il verificarsi del danno retinico. Si stima che solo la metà dei pazienti totali sia consapevole di avere il glaucoma [1]. Se non adeguatamente trattato, il glaucoma può progredire fino alla completa cecità poiché il danno a carico del nervo ottico è irreversibile. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito il glaucoma come una vera e propria patologia sociale che a causa della natura cronico-degenerativa ha ripercussioni significative sulla qualità di vita del paziente e di chi lo deve assistere [2]. Il glaucoma può essere classificato: ad angolo aperto (GAA) nel caso in cui vi sia l'aumento della PIO indotto da uno squilibrio nella produzione/deflusso di UA, ad angolo chiuso (GAC) se la radice iridea occlude l'angolo tra iride e cornea, ostacolando così la principale via di deflusso dell'UA, oppure congenito se presente già alla nascita [3]. L'evoluzione del termine glaucoma, di cui si hanno tracce sin da tempi antichissimi, sottolinea un forte legame tra conoscenze anatomiche, sviluppo di nuovi strumenti diagnostici ed obiettivi terapeutici che nel tempo hanno contribuito a definire meglio questa patologia. Nell'antica Grecia il termine *glaukos* (γλαυκός) venne usato come verbo (splendere) in relazione all'occhio "caldo" con glaucoma acuto, come sostantivo (gufo) di rimando agli occhi buftalmici caratteristici del glaucoma congenito oppure come aggettivo (blu-verde) per riferirsi al colore della pupilla colpita da edema corneale o cataratta [3]. A sottolineare uno dei principali fattori di rischio, ovvero l'invecchiamento, sarà Ippocrate che definì il glaucoma "una malattia accecante caratteristica dell'età avanzata". Vi sono dei casi in cui cataratta e glaucoma coesistono in un rapporto causa-conseguenza. Nella cataratta con pseudoesfoliazione, ad esempio, i detriti fibrillari che si accumulano sulla capsula provocano ispessimento del cristallino e irrigidimento della RT favorendo così l'insorgenza del GAA, nei soggetti con ipermetropia o con occhi piccoli la cataratta ipermatura può ostacolare il deflusso dell'UA e provocare GAC, ma esistono casi in cui le terapie farmacologiche per l'abbassamento della PIO possono portare ad un'opacizzazione più veloce del cristallino [4]. Questa correlazione era già stata notata da medici arabi antichi e medievali che rilevarono un'eccessiva durezza del cristallino nei soggetti colpiti da cataratta "a cascata". Sarà solo durante il Rinascimento che, con le nuove conoscenze sull'anatomia del cristallino, si iniziarono a studiare i disturbi causati dalla chiusura angolare. Si deve, invece, a Banister l'associazione tra glaucoma e neuropatia ottica. Per la teorizzazione di

una relazione tra malattia glaucomatosa e PIO bisognerà aspettare lo sviluppo del primo tonometro ad opera di Franciscus Cornelius Donders a metà del XIX secolo [1],[5]. La definizione canonica verrà proposta nel 1853 da William Mackenzie che nel “Practical Treatise of the Diseases of the Eye” descriverà il glaucoma come “una malattia in cui la PIO è elevata” [1],[6],[7]. Nel 1857 von Graefe scopre l'atrofia della testa del nervo ottico nei pazienti glaucomatosi. Solo alla fine del XX secolo si arriverà ad affermare che la PIO elevata non è una condizione strettamente necessaria nell'insorgenza del glaucoma, esistono infatti casi in cui essa è associata a un range di pressione normale [2]. Oggi il termine glaucoma racchiude una varietà di forme cliniche con patogenesi e sintomatologia (soggettiva e oggettiva) differente che richiedono approcci terapeutici personalizzati [2]. Sebbene non vi sia ancora un quadro struttura-funzione che unifichi tutti i fattori di rischio dei fenotipi finora riscontrati, in molti sostengono che, i gradienti di pressione generati nella camera anteriore contribuiscono alla neuropatia ottica nell'occhio posteriore (retina) come mostrato in Figura 1.0. Durante il rimodellamento glaucomatoso, le cellule della RT nell'occhio anteriore, le cellule gangliari retiniche (CGR) e la glia subiscono cambiamenti strutturali e funzionali per adattarsi agli sforzi meccanici indotti dalla PIO elevata. I trattamenti attuali, siano essi farmacologici, laser o chirurgici, hanno come obiettivo l'abbassamento e la stabilizzazione della PIO per evitare i danni indotti dalla pressione elevata. Anche se il parametro più semplice da monitorare è la PIO per caratterizzare completamente il glaucoma ed ottenere una valutazione clinica che tenga conto di ogni aspetto della malattia bisogna valutare attentamente:

- l'espressione genica alla scala nanometrica;
- i cambiamenti enzimatici, dei canali ionici, delle proteine citoscheletriche e dei recettori alla mesoscala;
- la neuropatia alla macroscale.

La coppedtazione della testa del nervo ottico, infatti, è solo il risultato finale del progredire della neuropatia ma vi è tutta una fase clinica precedente in cui è possibile intervenire per limitare i danni altresì irreversibili a carico del nervo ottico. A differenza di altre patologie degenerative, il glaucoma può essere fronteggiato attraverso una prevenzione primaria (screening oftalmologico) e secondaria (corretta informazione del paziente) al fine di garantire una maggiore aderenza ai trattamenti opportuni [2].

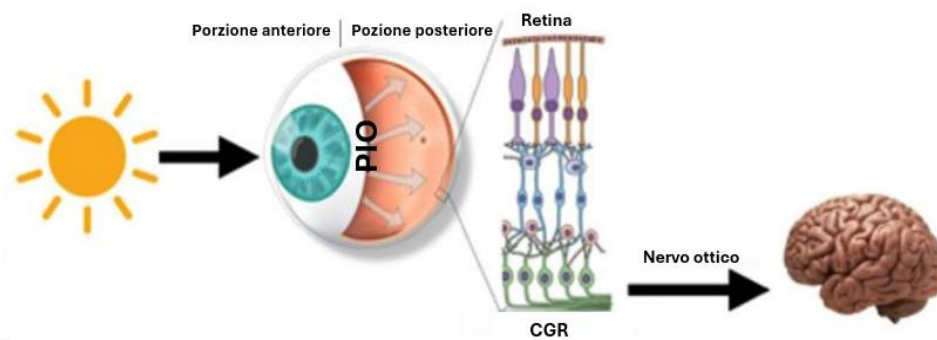


Figura 1.0: Schematizzazione dei processi biologici che avvengono tra porzione anteriore e posteriore dell'occhio nel glaucoma. La PIO generata nella porzione anteriore compromette la comunicazione del segnale visivo al cervello a causa del danno provocato alle CGR, situate nella parte posteriore [1].

1.2 Epidemiologia

Il glaucoma nonostante sia una patologia spesso sotto-diagnosticata e silente nelle forme croniche fino al manifestarsi dei sintomi derivanti dall'apoptosi delle cellule del nervo ottico, ha visto aumentare la sua incidenza negli anni in concomitanza con la crescente aspettativa di vita. Si contano circa 78 milioni di pazienti glaucomatosi nel mondo ed almeno 9 milioni di casi sono registrati in Europa. Nei prossimi 20 anni si presuppone che vi sarà un aumento del 33% dei casi accertati con punte del 50 % e sono previsti 111.8 milioni di pazienti entro il 2040. Il glaucoma è la seconda causa più frequente di cecità e ipovisione sia nei paesi avanzati sia in quelli in via di sviluppo. In Italia vi sono circa 4500 nuovi casi/anno di cecità causati da questa patologia. Si stima che in Italia le persone affette da glaucoma siano 1 milione con una incidenza del 48% al nord, del 28% nelle isole e del 24% al centro [2],[8]. La probabilità di sviluppare la malattia glaucomatosa è 6 volte maggiore tra le persone con un'età maggiore di 60 anni [9]. La prevalenza globale del GAA è del 3,5% mentre quella del GAC è dello 0,5% nei soggetti di età compresa tra 40 e 80 anni. I pazienti con GAC sono più inclini alla perdita completa della vista rispetto a quelli affetti da GAA (25% dei pazienti con GAC contro 10% dei pazienti con GAA) [10]. Il GAA ha una maggiore incidenza negli uomini rispetto alle donne e nelle persone di origine africana rispetto a quelle europee [11]. Il GAC colpisce un tasso più alto di donne rispetto agli uomini, ed ha una maggiore incidenza nella popolazione di origine asiatica, che generalmente ha una camera anteriore meno profonda. La popolazione Inuit ha maggiore probabilità di sviluppare GAC. Il tipo di glaucoma a tensione normale è più diffuso nei giapponesi. Anche se in tutti i tipi di glaucoma l'avanzare dell'età è un importante fattore di rischio strettamente collegato alla maggiore perdita di CGR [12],[11], il glaucoma rientra a pieno titolo tra i difetti congeniti e rappresenta l'80% delle cause di cecità e ipovisione nei bambini sino a cinque anni di età e più del 60% sino al decimo anno [2]. Questi numeri ci danno un'idea di quanto importante deve essere lo sforzo congiunto tra i diversi specialisti per trovare rimedi sempre più efficaci per contrastare il glaucoma.

1.3 Anatomia e fisiologia oculare

Per comprendere meglio quali strutture sono coinvolte nel rimodellamento glaucomatoso è necessaria un'introduzione sull'anatomia e sulla fisiologia oculare. L'occhio, oltre a captare le radiazioni luminose provenienti dal mondo esterno le trasduce in impulsi nervosi a scopo visivo e percettivo. Il bulbo oculare (schematizzato in Figura 1.1) è l'organo deputato alla vista. Normalmente ha un peso di circa 7-8 g e un volume di 6000-7000 mm³ [13].

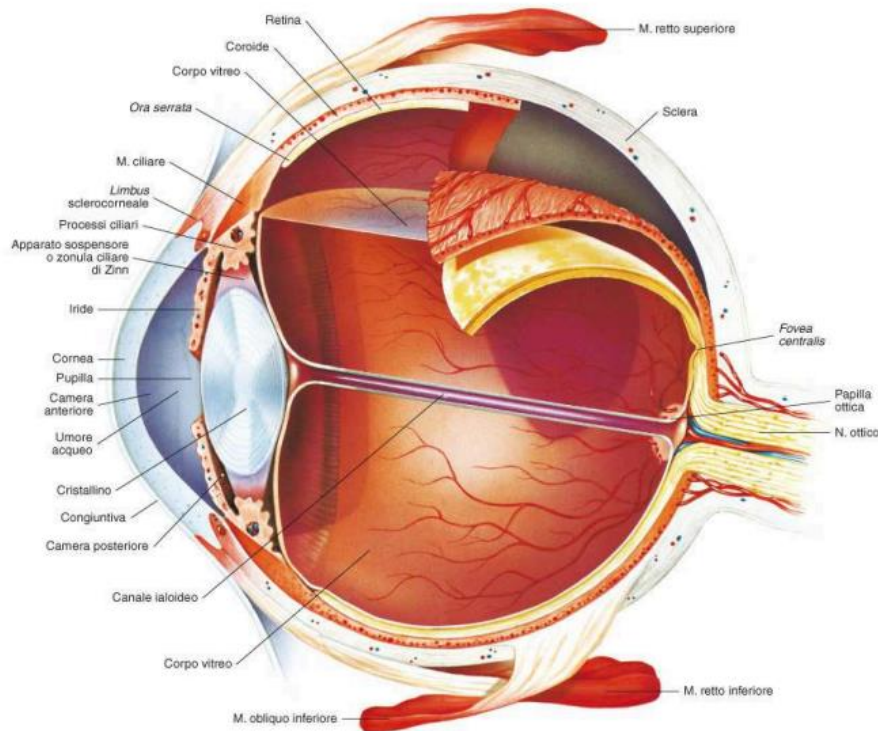


Figura 1.1: Anatomia dell'occhio [13]

L'occhio umano si divide in due porzioni: anteriore e posteriore [13].

La camera anteriore è delimitata anteriormente dalla faccia posteriore della cornea e dall'orlo sclero-corneale mentre posteriormente dalla faccia anteriore dell'iride e dalla parte del cristallino che si affaccia alla pupilla. Presenta una convessità in avanti e una leggera concavità posteriormente, termina in corrispondenza del sistema trabecolare e del margine ciliare irideo formando l'angolo irido-corneale. La camera anteriore comunica, attraverso la pupilla, con la camera posteriore permettendo la circolazione dell'UA. La camera posteriore di forma anulare è più piccola ed irregolare di quella anteriore. È delimitata anteriormente dall'iride e dal cristallino, nella parte periferica dalla superficie anteriore del corpo vitreo ed esternamente dai processi ciliari. Gli spazi zonulari tra le fibre della zonula ciliare che la attraversano contengono UA [14].

Grazie alla sua forma sferica leggermente schiacciata si individuano:

- Un asse ottico: di circa 24 mm che congiunge il polo anteriore (punto più sporgente della cornea) con il polo posteriore diametralmente opposto (sulla retina) ;

- Un asse visivo: congiunge il centro ottico dell'occhio (cristallino) alla fovea centralis (punto sulla retina distante circa 1 mm inferiormente e 4 mm lateralmente rispetto al polo posteriore) che garantisce la massima definizione visiva;
- Equatore anatomico: circonferenza in cui punti sono equidistanti dai poli anteriore e posteriore;
- Equatore geometrico: che unisce perpendicolarmente i due poli passando per punto centrale;
- Equatore funzionale: circonferenza individuata attraverso i punti in cui si inseriscono i muscoli retti.

Incrociando i piani di simmetria orizzontale e verticale si può idealmente dividere il bulbo oculare in quattro quadranti, due superiori e due inferiori.

Anteriormente il bulbo oculare è coperto dalle palpebre e dalla congiuntiva, una membrana epiteliale trasparente che oltre ad espletare il ruolo di protezione trova al suo interno distribuite le ghiandole per la produzione del film lacrimale. L'occhio, che poggia sul corpo adiposo dell'orbita, è mantenuto all'interno della cavità oculare grazie alla capsula formata dalla fascia di Tenone che va a fissarsi al margine orbitario. La mobilità è permessa grazie ad una fessura presente tra capsula e occhio.

Il bulbo oculare è costituito da tre membrane sovrapposte:

- La tonaca fibrosa, più superficiale, è divisa attraverso un solco anulare in cornea e sclera. La cornea è un piccolo segmento (circa 1/6 dell'intera tonaca fibrosa) trasparente, dal potere diottrico convergente e con capacità speculare (riflette i raggi luminosi esterni). Se si procede dalla porzione anteriore a quella posteriore è costituita da: epitelio corneale, lamina elastica anteriore di Bowmann, sostanza propria, lamina elastica posteriore di Descemet ed endotelio. È dotata di un'alta concentrazione di nervi ma è scarsa di vasi ematici per cui l'omeostasi è garantita grazie al contatto col film lacrimale nella porzione anteriore e con l'UA nella porzione posteriore. L'endotelio regola le concentrazioni di sale e metaboliti che dallo stroma passano nell'UA e viceversa. La sclera o sclerotica che occupa lo spazio restante è opaca e con raggio di curvatura maggiore rispetto alla cornea. Vasi e nervi passano attraverso i vari livelli della sclera grazie a piccoli orifizi. Lungo l'orlo di separazione tra sclera e cornea si trova il seno venoso della sclerotica o canale di Schlemm attraverso cui scorre l'UA.
- La tonaca vascolare o uvea, ricca di vasi sanguigni e tessuto muscolare liscio, si divide a sua volta in: coroide e porzione anteriore. La coroide, riccamente vascolarizzata per nutrire l'epitelio pigmentato e la retina, ha la forma di una sfera cava e si estende nella parte posteriore del bulbo oculare. Il pigmento che assume, grazie alla presenza dei vasi, serve ad impedire la riflessione dei raggi luminosi sulla sclerotica. La porzione anteriore forma con la retina il corpo ciliare e poi, proseguendo ulteriormente, l'iride. Il corpo ciliare, di forma anulare, si estende dall'iride fino alla coroide da cui è separato grazie al solco denominato ora serrata. Al suo interno si possono distinguere tre segmenti: l'orbicolo ciliare posteriormente, la corona ciliare anteriormente e il muscolo ciliare in posizione antero-esterna. Il muscolo ciliare deputato all'adattamento refrattivo è organizzato in fasci muscolari intramezzati con tessuto connettivo e vasi. Se le fibre sono organizzate circolarmente costituiscono la parte di muscolo del Muller mentre se disposte longitudinalmente fanno parte della zona del Brucke. L'iride è un diaframma,

con al centro la pupilla, che regola la quantità di luce che entra nell'occhio. È posto davanti al cristallino e vi entra in contatto con la sola parte centrale ma rimane separato dalla cornea grazie alla camera anteriore piena di UA. È formato da tre strati: l'endotelio che copre la faccia anteriore, lo stroma che contiene il muscolo sfintere della pupilla e l'epitelio la cui contrazione provoca dilatazione della pupilla.

- La tonaca nervosa o retina, è la membrana più profonda e si divide in: parte cieca e parte ottica. La parte cieca della retina, insensibile alla luce, è la parte anteriore che non partecipa alla formazione del nervo ottico bensì a quella del corpo ciliare e dell'iride [14]. La parte ottica della retina da cui origina il nervo ottico, è la parte posteriore e si estende dall'entrata del nervo ottico fino all'ora serrata. Le fibre nervose che hanno origine nella retina e che vanno a costituire il nervo ottico convergono in una zona detta papilla. La papilla, situata sullo stesso piano della retina a circa 3-4 mm di distanza dal polo posteriore, presenta al centro una depressione detta escavazione fisiologica, insensibile alla luce, dalla quale emergono i vasi retinici. La retina vera e propria è composta da: epitelio pigmentato che assolve al compito di assorbimento della luce; fotorecettori la cui iperpolarizzazione è indotta dallo stimolo luminoso che si dividono per la forma assunta in coni (responsabili della visione a colori) e bastoncelli (responsabili della visione crepuscolare); cellule bipolari (ON e OFF) che creano un meccanismo opposto-polare regolato dal rilascio dei neurotrasmettitori da parte dei fotorecettori; cellule gangliari i cui assoni formano lo strato delle fibre del nervo ottico; cellule del Muller che svolgono funzione trofica e cellule orizzontali e cellule amacrine che ottimizzano il contrasto mediante raggruppamento di più elementi sinaptici [15]. La retina è irrorata da due distretti vascolari: l'arteria centrale irroro le cellule gangliari e bipolari coadiuvata da cellule gliali mentre il sistema della coriocapillare nutre l'epitelio pigmentato e i fotorecettori.

In aggiunta alle strutture che originano dalla tonaca fibrosa, vascolare e nervosa si trovano diversi altri elementi a costituire l'apparato visivo.

- Il cristallino o lente è un organo trasparente ed elastico a forma di lente biconvessa situato tra l'iride e il corpo vitreo. La plasticità del cristallino che diminuisce con l'avanzare dell'età è indispensabile per l'accomodazione visiva o messa a fuoco. È formato da: capsula (membrana trasparente ed elastica che ricopre l'intera lente), epitelio semplice nella faccia anteriore e dalla sostanza del cristallino (fibre cristalline flessibili e trasparenti il cui citoplasma è ricchissimo di acqua). Mancando di nervi, vasi sanguigni e linfatici necessita dell'UA per la nutrizione.
- Zonula ciliare di Zinn, un complicato sistema di fibre zonulari, che si trova tra il corpo ciliare ed il cristallino, va a formare l'apparato sospenditore del cristallino. Serve a regolare la convessità del cristallino sotto l'influenza della contrazione o distensione del muscolo ciliare, la convessità aumenta se il muscolo si contrae e viceversa. Gli spazi zonulari presenti tra le fibre sono colmati dalla presenza dell'UA.
- Il corpo vitreo è un organo contenente il 98,4% di acqua, incolore, sferoidale, scarsamente cellularizzato, dalla consistenza gelatinosa e vischiosa che occupa la zona che va dal cristallino alla retina.
- Il nervo ottico che ha una lunghezza complessiva di circa 5 cm ed un diametro di 3-4 mm, è costituito da circa un milione di fibre nervose. Avvolto dalla membrana sottile

della capsula del bulbo attraversa in direzione sagittale la cavità orbitaria, il forame ottico e la cavità cranica. Per permettere che i movimenti di rotazione oculari avvengano senza che il nervo risenta della tensione che questi imporrebbero se fosse perfettamente rettilineo assume nel tratto in cui attraversa l'orbita una conformazione ad S. Il nervo ottico è considerato parte integrante del sistema nervoso centrale poiché le guaine durale, aracnoideale e piaie che lo avvolgono rappresentano una continuazione delle meningi. La parte intraoculare del nervo ottico di forma conica a base esterna (diametro interno di circa 1,5 mm ed esterno di circa 3,0 mm) lunga circa 0,7-1,0 mm è detta testa del nervo ottico. La parte della testa del nervo ottico visibile con un esame del fondo oculare è detta invece papilla ottica. Quest'ultima è costituita da: fibre ganglionari amieliniche che confluiscono incurvandosi verso il nervo ottico vero e proprio grazie al sostegno della lamina cribrosa, astrociti, oligodendrociti, microglia, tessuto connettivale e vasi [16].

- L'umore acqueo è un fluido trasparente, acellulare a bassa viscosità che riempie per 0.25 ml la camera anteriore e per 0.06 ml la camera posteriore del bulbo oculare. Si forma per ultrafiltrazione del plasma a causa del gradiente di pressione dato dal flusso sanguigno nell'interstizio ciliare e per secrezione nell'epitelio dei processi ciliari. L'UA passa dalla camera posteriore a quella anteriore attraversando la pupilla e scorrendo fra iride e cristallino. Viene riassorbito in corrispondenza dell'angolo dell'iride e, poiché sottoposto a PIO, defluisce attraverso la RT fino a raggiungere il canale di Schlemm ed infine le vene episclerali. Tra i suoi ruoli principali si annoverano: mantenimento di una PIO adeguata (14 - 20 mmHg), nutrimento del cristallino e della cornea, mantenimento della trasparenza, rimozione di macrofagi, metaboliti e prodotti di infiammazione dalla camera anteriore. È composto al 99.9% da acqua mentre la parte solida è costituita da: proteine, aminoacidi e costituenti non colloidali (glucosio, urea, ascorbato, acido lattico, inositolo, Na^+ , K^+ , Cl^- , CHO_3^-).

Nella formazione dell'UA sono coinvolti tre meccanismi:

- Secrezione attiva (70%): vede come attori principali gli ioni Na^+ e Cl^- che vengono trasportati dallo stroma alle cellule dell'epitelio pigmentato attraverso gli antiporti Na^+ / H^+ e Cl^- / CHO_3^- . Le giunzioni strette dell'epitelio non pigmentato permettono invece il passaggio attivo di sodio, cloruri, potassio, acido ascorbico, amminoacidici e bicarbonati nella camera posteriore. Il trasporto attivo nel sito delle cellule epiteliali non pigmentate avviene tramite l'idrolisi dell'ATP in ADP, mediata dall'enzima Na-K-ATPasi. L'anidrasi carbonica (enzima presente sia negli epitelii ciliari pigmentati che non pigmentati), catabolizzando la reazione che produce bicarbonato e ione idrogeno, contribuisce a regolare il pH e il trasporto degli ioni attivi. L'acqua si muove passivamente seguendo i gradienti osmotici innescati dal trasporto attivo e dalla concentrazione degli ioni coinvolti.
- Ultrafiltrazione (20%): le sostanze plasmatiche che fuoriescono dalle pareti dei capillari e dal tessuto connettivo lasso permettono l'accumulo del plasma dializzato dietro l'epitelio pigmentato e non pigmentato.
- Diffusione (10%): Il gradiente osmotico, che si crea in seguito al passaggio delle sostanze attraverso l'epitelio ciliare non pigmentato, permette la diffusione di altri costituenti plasmatici nella camera posteriore. Il sodio, in particolare, governa il

passaggio di acqua nella camera posteriore. Quando l'UA passa dalla camera posteriore al canale di Schlemm avviene uno scambio diffusivo con le strutture circostanti. Questo è il motivo per cui l'UA nella camera anteriore assomiglia di più al plasma [17].

L'esatto meccanismo del drenaggio dell'UA è ancora dibattuto e per questo motivo vengono proposti percorsi di drenaggio convenzionali e non convenzionali. L'UA fluisce dalla camera posteriore alla camera anteriore passando attraverso la pupilla. Nel percorso convenzionale continua attraverso il trabecolato (con un meccanismo passivo), il canale di Schlemm, i canali collettori, il sistema venoso episclerale per poi finire nella circolazione cardiovascolare sistemica. Nel percorso non convenzionale drena nell'interstizio del muscolo ciliare attraverso il reticolo uveale anziché il reticolo trabecolare. Questo percorso si suddivide nei percorsi uveosclerali, uveovortice e uveolinfatici che hanno rispettivamente come sfogo finale: il sistema vascolare orbitale, le vene vorticosi e i vasi linfatici ciliari [18].

1.3.1 Tensione oculare e UA

L'UA per poter adempiere alle sue funzioni ottiche (fa parte del sistema diottrico oculare), trofiche e di mantenimento della forma e del volume oculare ha la necessità di un ricambio completo e continuo. Come già detto, la sua formazione è dovuta principalmente all'attività di filtrazione, regolata dal gradiente osmotico e idrostatico, nell'epitelio ciliare. La secrezione attiva, frutto di processi innescati dallo scambio di ioni nelle cellule dell'epitelio ciliare, è mediata dall'attività enzimatica dell'ATPasi e dall'anidrasi carbonica e prevede che vi sia l'ingresso di sodio nelle cellule non pigmentate, il trasporto attivo dello stesso negli spazi intercellulari prossimali dell'epitelio pigmentato con conseguente creazione di un microgradiente osmotico che richiama l'acqua distalmente, verso la camera posteriore. Il meccanismo passivo, che prevede il passaggio esclusivo di acqua e piccoli ioni, è invece permesso grazie allo strato stromale sottile dei capillari ciliari e dalle giunzioni lasse che interconnettono le cellule epiteliali non pigmentate. Dopo la sua produzione l'UA passa dalla camera posteriore a quella anteriore attraverso il foro pupillare per poi defluire nell'angolo della camera anteriore. Il deflusso avviene in gran parte attraverso le maglie del trabecolato corneosclerale (80-90%) ed il sistema di vene acquose-vene episclerali. Una parte di UA passa invece nelle vie uveosclerali e abbandona la cavità oculare attraverso la sclera (restante 20-10%) [19]. Il deflusso irideo che avviene per assorbimento diretto da parte dell'iride risulta essere quasi irrilevante.

Per arrivare ad una definizione di PIO bisogna adottare un modello matematico che tenga conto di tutte le considerazioni fatte finora sull'UA. Indicando con U [mm^3] il volume totale di UA, questo varia nel tempo seguendo l'equazione 1.0 [1]:

$$\frac{dU}{dt} = F_h - F_e \quad (1.0)$$

Dove

- F_h [$mm^3 * min^{-1}$] è la portata dell'UA che entra nella camera posteriore;
- F_e [$mm^3 * min^{-1}$] è la portata dell'UA che esce dalla camera anteriore.

Normalmente la resistenza al deflusso è molto più grande rispetto alla resistenza al flusso tra le camere oculari per cui quest'ultima viene trascurata e la pressione nelle due camere oculare sarà assunta uguale e pari alla PIO. Date queste approssimazioni si può descrivere la portata uscente come frutto di una differenza di pressione idrostatica, come indicato nell'equazione 1.1:

$$F_e = \frac{p - p_e}{R} \quad (1.1)$$

Dove

- p [mmHg] è la PIO;
- p_e [mmHg] è la pressione episclerale o d'uscita dove la maggior parte dell'UA confluisce nel sistema cardiovascolare;
- R [mmHg * min * mm⁻³] è la resistenza idraulica che si oppone al deflusso dell'UA

È possibile considerare, in prima approssimazione, le pareti dei capillari, lo spazio interstiziale e l'epitelio del corpo ciliare come un'unica membrana semipermeabile per i componenti a basso peso molecolare ed impermeabile per le proteine. Il flusso attraverso la membrana equivalente sarà causato dalle differenze di pressione idrostatica e osmotica tra l'UA e il flusso sanguigno [21] e verrà descritto dall'equazione 1.2:

$$F_h = L_p[(p_a - p) - s_p \Delta \Pi_p - s_s \Delta \Pi_s] \quad (1.2)$$

Dove

- L_p [mm³ · (min · mmHg)⁻¹] è la permeabilità della membrana equivalente;
- p_a [mmHg] è la pressione dei capillari del corpo ciliare;
- p [mmHg] è la PIO;
- $\Delta \Pi_p$ [mmHg] è la differenza di pressione osmotica prodotta dalle proteine;
- $\Delta \Pi_s$ [mmHg] è la differenza di pressione osmotica prodotta dalle componenti a basso peso molecolare;
- s_p è il coefficiente di riflessione delle proteine;
- s_s è il coefficiente di riflessione delle componenti a basso peso molecolare.

Indicando con C_{p1} [g* dl⁻¹] la concentrazione di proteine nel plasma e con C_{p2} [g* dl⁻¹] la concentrazione di proteine nell'UA si può assumere $C_{p2} \approx 0$, $s_p=1$ e $C_{p1} \equiv C_{p1} \cong 7 \text{ g* dl}^{-1}$ poiché il contenuto proteico nell'UA è trascurabile.

La pressione osmotica sarà quindi determinata dalla concentrazione delle proteine del sangue arterioso come descritto dall'equazione 1.3 proposta da Landis e Pappenheimer [22], [23].

$$\Pi_p = \Delta \Pi_p = b_1 C_{p1} + b_2 C_{p1}^2 + b_3 C_{p1}^3 \quad (1.3)$$

Dove

- b_1, b_2, b_3 sono coefficienti che modellizzano le proteine plasmatiche;
- il termine del primo ordine rappresenta la legge di van't Hoff ($\Pi = cRT$ dove c è la concentrazione dei soluti, R è la costante universale dei gas e T è la temperatura assoluta);
- il termine quadratico tiene conto della diffusione degli ioni senza consumo di energia (effetto Donnan);
- il termine cubico considera le interazioni proteina-proteina (in questo modello non si tiene conto del contributo dell'interazione globulina-albumina).

La pressione osmotica dovuta al movimento di componenti a basso peso molecolare attraverso la membrana, come evidenzia l'equazione 1.4, è proporzionale alla differenza delle concentrazioni molari che si hanno rispettivamente nel plasma e nell'UA in prossimità del corpo ciliare moltiplicata per il prodotto tra la costante universale dei gas perfetti e la temperatura assoluta.

$$\Delta\Pi_s = \rho(C_1 - C_2) \quad (1.4)$$

Dove

- $\rho [L * mmHg * mol^{-1}] = RT$ con $R = 62.3637 L * mmHg * (mol * K)^{-1}$ e T espressa in K ;
- $C_1 [mol * L^{-1}]$ concentrazione molare totale di componenti a basso peso molecolare nel sangue;
- $C_2 [mol * L^{-1}]$ concentrazione molare totale di componenti a basso peso molecolare nell'UA.

L'ultrafiltrazione produce un flusso Q_1 diretto verso la camera posteriore che viene bilanciato dal flusso Q_2 dovuto alla resistenza imposta dalle giunzioni strette delle cellule dell'epitelio non pigmentato a farsi attraversare dall'acqua. Il flusso dei soluti, dovuti a fenomeni attivi, diffusivi e convettivi, è quindi determinato dall'equazione 1.5:

$$Q_s = \xi_s(C_1 - C_2) + F_h(1 - s_s)\bar{C} + J \quad (1.5)$$

Dove

- $\bar{C} \approx \frac{(C_1 - C_2)}{2} [mol * L^{-1}]$;
- $\xi_s [mm^3 * s^{-1}]$ è la permeabilità media della membrana per le specie a basso peso molecolare;
- $J [\mu mol/min]$ flusso dovuto al trasporto attivo.

Fissando i valori L_p , σ_s , C_1 , $\Delta\Pi_p$, p_a , p_e questa equazione può essere semplificata come indicato nell'equazione (1.5*)

$$F_h(1 - s_s)\bar{C} + J = F_h C_2 \quad (1.5^*)$$

Assumendo che la velocità di afflusso sia stazionaria ed uguale alla velocità di deflusso, tenendo conto delle sole pressioni osmotiche (1.4) ed idrostatiche (1.1) si può impostare l'uguaglianza (1.6).

$$F_h = F_e \Rightarrow L_p[(p_a - p) - s_p \Delta \Pi_p - s_s \Delta \Pi_s] = \frac{p - p_e}{R} \quad (1.6)$$

$$\Rightarrow F_h = F_e = \frac{L_p}{RL_p + 1} (p_a - \Delta \Pi_p - s_s \Delta \Pi_s) + p_e$$

Da cui si ricava la definizione di PIO (1.7)

$$p = PIO = \frac{RL_p(p_a - \Delta \Pi_p - s_s \Delta \Pi_s) + p_e}{RL_p + 1} \quad (1.7)$$

La PIO è la pressione intraoculare risultante dall'equilibrio tra la quantità di UA prodotta dalla pars plicata del corpo ciliare (~2,4 µl/min durante il giorno negli adulti sani) e quella che viene defluita in maniera continua attraverso il trabecolato a livello dell'angolo camerulare [24]. Il tono oculare risulta regolato dalla resistenza imposta dal trabecolato iridocorneale a farsi attraversare dall'UA. Il deflusso di UA attraverso il canale di Schlemm è pressione-dipendente, infatti, la compressione a cui sono sottoposti gli spazi tra le lamelle connettivali del trabecolato e il canale di Schlemm aumenta la resistenza della RT e provoca un aumento della PIO.

Visto che nella formazione dell'UA sono coinvolti più meccanismi interdipendenti vi sono molti fattori che influenzano la portata volumetrica come ad esempio: la permeabilità e il flusso plasmatico capillare, alterazioni delle giunzioni intercellulari epiteliali e la pressione osmotica plasmatica. Sebbene il primo passo nella formazione dell'UA dipenda dal flusso sanguigno, la pressione sistemica non ha alcun effetto sulla PIO in quanto la percentuale di plasma filtrato è pari a circa il 4%.

La PIO risulta essere modulata dal sistema nervoso autonomo grazie all'intervento dei versanti parasimpatico ed ortosimpatico. Il sistema simpatico cervicale ed il blocco del sistema b-adrenergico riducono la produzione di UA mentre il sistema parasimpatico ed il blocco del sistema a-adrenergico migliorano la pervietà delle vie di deflusso grazie alla contrazione del muscolo ciliare e dello sfintere dell'iride; in entrambi i casi si ha come risultato un abbassamento della PIO [14], [25]. La PIO ha un suo ritmo circadiano, infatti varia nell'arco della giornata. Il deflusso di UA si riduce del 50% durante la notte rispetto al giorno e questo comporta un aumento del rischio di sviluppare danni oculari acuti indotti dalla pressione elevata durante il sonno. L'ampiezza e il ritmo delle fluttuazioni della PIO sono regolati dai geni Cry1 / Cry2 e dal rilascio locale di melatonina, che raggiunge il picco durante la notte ed è più pronunciato nei pazienti affetti da glaucoma. Nella popolazione adulta sana la PIO media è di circa 15-16 mmHg con una deviazione standard di 2.5 mmHg ma è definita "normale" una PIO fino a 21 mmHg.

I fattori che influenzano la PIO possono essere riassunti come segue:

- velocità di formazione dell'UA e la resistenza al deflusso acqueo: un rallentamento o un impedimento del deflusso attraverso la RT e il canale di Schlemm portano ad ipertono oculare,
- errori di rifrazione: gli individui miopi hanno una PIO più elevata,
- età: la PIO media aumenta dopo i 40 anni,
- sesso: è più alta nelle donne,
- sostanze e/o i farmaci: il fumo di tabacco, la caffeina e gli steroidi possono causare un aumento della PIO mentre l'alcol l'abbassamento,
- esercizio fisico intenso: abbassa temporaneamente la PIO [17].
- Battere le palpebre, grattarsi gli occhi, starnuti e movimenti oculari elevano transitoriamente la PIO (fino a 200 mmHg).

1.4 Classificazione

Con il termine glaucoma si indicano molte forme cliniche e patologie che provocano un progressivo danno al nervo ottico (a volte associato a un'elevata PIO). Ogni forma clinica presenta segni e sintomi diversi e per questo motivo è necessaria una classificazione al fine di comprendere meglio le strategie risolutive più efficaci da attuare per rallentare il progredire della malattia glaucomatosa.

Il glaucoma può essere: Primario nel caso in cui non si abbia una causa specifica a generarlo oppure secondario nel caso in cui sia consequenziale a delle patologie o cause specifiche come ad esempio infezioni, tumori, infiammazioni, cataratta avanzata, farmaci o altri disturbi. Un'ulteriore suddivisione, che si basa sull'ampiezza dell'angolo irido-corneale (dove avviene il riassorbimento dell'UA), permette la distinzione tra glaucoma ad angolo aperto ($> 20^\circ$) e ad angolo chiuso. Infine, i glaucomi possono essere definiti congeniti se presenti sin dalla nascita.

1.4.1 Glaucomi ad angolo aperto

Il Glaucoma primario ad angolo aperto (GPAA) è una patologia oculare cronica con un andamento progressivo ed asintomatico. È in grado di causare cecità irreversibile a causa del danno ischemico indotto a livello del bordo neuro retinico papillare, delle fibre nervose e delle cellule gliali. È spesso bilaterale e si manifesta con limitazione del campo visivo. I principali fattori di rischio comprendono: PIO elevata (> 21 mm Hg) anche se nel 15-20% dei casi si può presentare con valori pressori normali, età avanzata, miopia, fumo e patologie cardiovascolari. L'eziologia è poco chiara e probabilmente vede l'influenza di fattori genetici, stati morbosi e vascolari. L'angolo situato tra la radice dell'iride e la Linea di Schwalbe è aperto e non ostacola di per sé il deflusso dell'UA. L'aumento di PIO è dovuto alla resistenza trasecolare (ostacolo meccanico) che impedisce il passaggio dell'UA dalla camera posteriore a quella anteriore. In molti ritengono che i livelli elevati di PIO portino alla deformazione della lamina cribrosa e di conseguenza alla morte per apoptosi delle CGR. Circa 20 loci potrebbero essere coinvolti nell'eziologia del glaucoma primario [10], [26]. Si è osservato che i soggetti con mutazioni a carico dei geni MYOC (che codifica per la miocillina nel trabecolato) e OPTN (che codifica per l'optineurina presente nell'epitelio

ciliare non pigmentato e nella retina) sono molto predisposti a sviluppare GPAA. Il GPAA può essere suddiviso in malattia a pressione elevata e a pressione normale. Nel primo caso sono le alterazioni anatomiche o funzionali dell'occhio a portare degli squilibri tra la produzione e il drenaggio dell'UA. Questa sproporzione induce un aumento della PIO fino a valori pericolosi per le fibre ganglionari del nervo ottico che si danneggiano per schiacciamento (teoria meccanica). Il glaucoma a tensione normale sembrerebbe invece generarsi a causa di meccanismi ischemici cronici a carico della testa del nervo ottico (teoria vascolare) e dalla scarsa pressione del liquido cerebrospinale.

I glaucomi secondari ad angolo aperto (GSAA) si manifestano a seguito di altre patologie oculari. Nel caso della sindrome pseudoesfoliativa, ad esempio, i detriti furfuracei che si staccano dal pigmento uveale vanno in sospensione nell'UA o si depositano sul cristallino provocando un irrigidimento della RT e un'evoluzione della malattia glaucomatosa di circa tre volte più rapida rispetto al GPAA. Nel glaucoma pigmentario (GP) sono invece i granuli di melanina che vengono rimossi dall'epitelio pigmentato, per effetto dello sfregamento con l'iride posteriore, che portano ad un aumento della resistenza al deflusso dell'UA. Il GP ha un'incidenza che varia tra l'1-1,5% dei casi totali di glaucoma ed è molto frequente nei soggetti europei di sesso maschile. Nel GSAA indotto dal cristallino il normale flusso dell'UA è impedito da particelle, cellule infiammatorie e precipitati cheratici formati a causa di danni a carico della lente o dovuti alla cataratta matura. La presenza di sangue, macrofagi carichi di emoglobina o da globuli rossi degenerati possono modificare il normale deflusso di UA attraverso la RT e dare origine a glaucoma emolitico o a glaucoma da cellule fantasma. Questo tipo di glaucoma si manifesta a causa di sanguinamento acuto nella camera anteriore o persistente in quella vitrea ed è caratterizzato da dolore e irritazione del bulbo. Circa il 20% dei pazienti affetti da uveite è affetto anche da glaucoma uveitico, edema della RT, cicatrizzazione secondaria e neovascolarizzazione dell'angolo irido-corneale. Nei pazienti affetti da sindrome di Posner-Schlossman o infezioni virali si può verificare un innalzamento acuto della PIO mentre un aumento cronico della PIO è comune in caso di uveite di Fuchs, artrite giovanile idiopatica e malattia di Behcet. Altri fattori che possono innescare la malattia glaucomatosa ad angolo aperto secondaria sono: tumori intraoculari primari o secondari, alterazioni o contusioni traumatiche del trabecolato, cambiamenti conformazionali delle glicoproteine della matrice extracellulare della RT indotte da corticosteroidi, reazioni infiammatorie o perdite di pigmento uveali conseguenti a chirurgia oculare. Il trattamento di questi tipi di glaucoma prevedono terapie atte ad abbassare la PIO e a curare le cause primarie.

1.4.2 I glaucomi ad angolo chiuso

I glaucomi ad angolo chiuso sono contraddistinti dal contatto irido-trabecolare (CIT) in assenza di patologie oculari in cui questo è un segno caratterizzante. Il CIT può essere causato o da sovraffollamento delle strutture anatomiche del distretto anteriore del bulbo oppure dalla formazione di aderenze periferiche anteriori, si distinguono quindi forme apposizionali (reversibili) e sinechiali. Rappresentando un ostacolo (meccanico) al normale deflusso dell'UA il CIT può provocare un aumento della PIO sia in forma acuta che progressiva. [10], [27]

I meccanismi responsabili della chiusura d'angolo possono essere:

- Meccanismo del blocco pupillare: è il meccanismo preponderante (circa il 75-90% dei casi). L'UA incontra una resistenza nel defluire dalla camera posteriore all'anteriore attraverso la pupilla, di conseguenza la pressione nella camera posteriore aumenta e l'iride si incurva fino a che non viene in contatto con il trabecolato e/o con la cornea. Il blocco pupillare è molto probabilmente causato da un'attivazione contemporanea dello sfintere e del muscolo dilatatore che causa una risultante delle forze perpendicolare al cristallino quando la pupilla si dilata.
- Anomalie a livello del corpo ciliare o "iride a plateau": in questi casi l'iride è molto vicina o in contatto con il trabecolato a causa del restringimento dell'angolo. Il restringimento angolare è imputabile al fatto che sia l'iride che il corpo ciliare sono più spessi ed in posizione più avanzata rispetto ai valori standard.
- Anomalie a livello del cristallino: la profondità della camera anteriore è determinata dallo spessore e dal posizionamento del cristallino. Nei casi di pazienti con chiusura angolare la lente è più spessa e spostata anteriormente.
- Anomalie posteriori al cristallino: una forma rara ma molto aggressiva di chiusura dell'angolo irido-corneale è la misdirezione dell'UA, nota come glaucoma maligno.

In genere la chiusura angolare è distinta in chiusura angolare primaria e chiusura angolare secondaria. La Chiusura angolare primaria (CAP) è caratterizzata dalla formazione di sinechie periferiche anteriori ed aumento della PIO senza evidenza di neuropatia ottica glaucomatosa. Il contatto tra iride e RT è dovuto a predisposizione anatomica. Qualora si verifichi la neuropatia la CAP assumerà la denominazione di glaucoma primario ad angolo chiuso (GPAC). Età avanzata, l'aumento del volume del cristallino nel corso della vita, anamnesi familiare positiva e l'ipermetropia sono i principali fattori di rischio per la CAP. Le donne sono colpite con maggiore frequenza (75% dei casi) rispetto agli uomini e le popolazioni più colpite sono quelle del sud-est asiatico. Il GPAC può avere sintomi e segni diversi ed ognuno di questi è influenzato dalla patogenesi della neuropatia. Si distinguono normalmente chiusure angolari acute, in cui la PIO aumenta repentinamente fino a raggiungere 50-70 mmHg a causa di un contatto iride-RT circonferenziale e chiusure intermittenti o subacute in cui i sintomi sono simili ma reversibili spontaneamente poiché il meccanismo di CIT è autolimitante. L'attacco "acuto" è un evento estremamente aggressivo e può provocare a danni irreversibili alla vista, cefalea, dolori nausea e vomito ma esistono forme di GPAC a progressione lenta e cronica dove il livello variabile di CIT sinechiale causa innalzamento della PIO e rimodellamento glaucomatoso, privo o quasi di sintomatologia fino alla comparsa di danni a carico del nervo ottico.

Nella chiusura angolare secondaria il CIT origina da altre condizioni e/o patologie oculari. Ad esempio, quando l'iride si dilata delle forze centripete posteriori possono indurre un maggior contatto della stessa con il cristallino. Questo contatto, detto blocco pupillare, può ostruire il passaggio dell'UA dalla camera posteriore. L'UA che viene secreto continuamente nella camera posteriore genera una pressione che spinge l'iride in avanti (iride bombè) e chiude l'angolo. Questo blocco del deflusso di UA dà origine a glaucoma ad angolo chiuso secondario acuto. Le cause del blocco pupillare possono essere molteplici, tra le principali vi sono: cristallino rigonfio, lussazione della lente e assunzione di farmaci miotici. In pazienti affetti da malattie del microcircolo oculare si possono formare, in concomitanza alle ischemie retiniche, delle

membrane fibrovascolari irido-trabecolari che in prima battuta portano a GAA secondario ma negli stati più avanzati progrediscono verso chiusure sinechiali per contrazione.

1.4.3 I glaucomi congeniti

Il glaucoma congenito primario (GCP) è caratterizzato da aumento di PIO dovuto ad un deflusso ridotto di UA imputabile o a disgenesia dell'angolo irido-corneale e/o allo sviluppo incompleto della RT. Rientra nella categoria delle patologie rare e necessita di una diagnosi precoce poiché non sempre è sintomatico. Segni clinici caratteristici sono: blefarospasmo, lacrimazione, fotofobia, edema corneale ed escavazione tardiva della papilla ottica. Il diametro corneale (>10,5 mm alla nascita e di >12 mm al primo anno di vita) e la lunghezza assiale (>20 mm alla nascita o >22 mm dopo il primo anno) sono ben sopra la media dei valori fisiologici misurati nei bambini non affetti da GCP. Esistono casi in cui i pazienti, pur presentando segni tipici del GCP, hanno valori stabili e normali di PIO e quindi possono essere classificati come guariti spontaneamente [10]. Il glaucoma infantile ad angolo aperto ha normalmente un esordio che va dai due anni di età fino alla pubertà. Eziologia e fisiopatologia sono del tutto simili a quelle del GCP ma non si ha nessun ingrandimento del bulbo né anomalie oculari o sindromi congenite. Resta asintomatico fino alla manifestazione di un difetto del campo visivo dovuto al danno a carico del nervo ottico [10]. I glaucomi infantili secondari si manifestano con meccanismi patogenetici diversi a seconda della causa primaria da cui originano. La gestione di questo tipo di glaucoma prevede di risolvere le anomalie oculari, le sindromi o le patologie sistemiche acquisite o non-acquisite cui consegue.

1.5 Diagnosi

Per effettuare una diagnosi di glaucoma bisogna sottoporre il paziente ad una visita oculistica corredata di tonometria, oftalmoscopia stereoscopica con lampada a fessura, tomografia a coerenza ottica (OCT). Lo scopo di questi esami è quello di valutare la PIO, l'aspetto della testa del nervo ottico, la degenerazione delle RGC, il danno funzionale e la compromissione della funzione visiva laterale. I pazienti a rischio per il glaucoma ad angolo chiuso vengono sottoposti anche alla gonioscopia [1]. Negli ultimi tempi in aggiunta agli esami atti a rilevare il danno anatomico-funzionale delle cellule ganglionari si ricercano anche anomalie vascolari soprattutto per diagnosticare le forme di glaucoma "a bassa pressione". Se la diagnosi negli stadi avanzati è più semplice (valutazione del danno del nervo ottico) non esiste ancora un esame/test che riesca ad essere abbastanza specifico e sensibile nella diagnosi precoce quindi vi è la necessità per l'oftalmologo di confrontare risultati derivanti da diversi esami/valutazioni diagnostiche ripetute nel tempo (follow-up) [16].

- Tonometria

Rilevare la PIO è fondamentale sia per la formulazione della diagnosi che per valutare l'efficacia delle terapie ipotonizzanti che mirano a raggiungere un valore pressorio target. Il principio su cui si basano i tonometri risiede nell'applicazione di una forza nota sulla superficie corneale e nel rilevare la deformazione indotta. Dalla relazione tra forza e deformazione è possibile ricavare la PIO sfruttando il principio di Imbert-Fick secondo cui la pressione

all'interno di una sfera è uguale alla forza necessaria per appiattire la sua superficie divisa per l'area di appiattimento ($P = F/A$) quando la sfera è asciutta, infinitamente sottile e perfettamente flessibile. Uno dei tonometri più diffusi, almeno fino a metà anni '50, è stato il tonometro di Schiotz che propone di indentare la cornea attraverso uno stantuffo di peso noto e regolabile (con l'aggiunta di pesetti). La lettura della PIO corrispondente alla deformazione imposta avviene attraverso tavole di conversione. A causa dell'elevato volume di fluido intraoculare dislocato durante la misurazione quest'ultima risente della rigidità sclerale. Per tenere conto delle proprietà biomeccaniche della cornea Goldmann e Schmidt proposero una modifica del modello di Imbert-Fick (figura 1.2) in cui lo stroma, delimitato tra le membrane concentriche M1 e M2, è un liquido che esercita una pressione fluida P1. Il fluido intraoculare, delimitato dalla membrana M2, esercita invece la pressione P2 che risulta essere equivalente alla PIO quando la zona di appianazione corneale interna è proporzionale a quella esterna, ovvero quando il diametro esterno si appiattisce di 3,06 mm [17,18]. In questo modo, durante l'appianazione si sposta meno liquido e le misure sono più affidabili. Il tonometro ad appianazione di Goldmann (GAT), montato su lampada a fessura, rappresenta il gold standard nella pratica clinica per la misurazione della PIO. Il modello, a fronte di un'ulteriore modifica che tiene conto dell'elasticità corneale e della tensione superficiale del liquido lacrimale, può essere descritto dall'Equazione 1.8 [29].

$$P+M'=F/A + N' \quad (1.8)$$

Dove

F: Forza (GAT) che agisce sulla cornea;

A: Area dello stantuffo che agisce sulla cornea;

P: Pressione intraoculare;

M': Elasticità della cornea che spinge verso il tonometro;

N': tensione superficiale del liquido lacrimale che attira la sonda del tonometro verso la cornea.

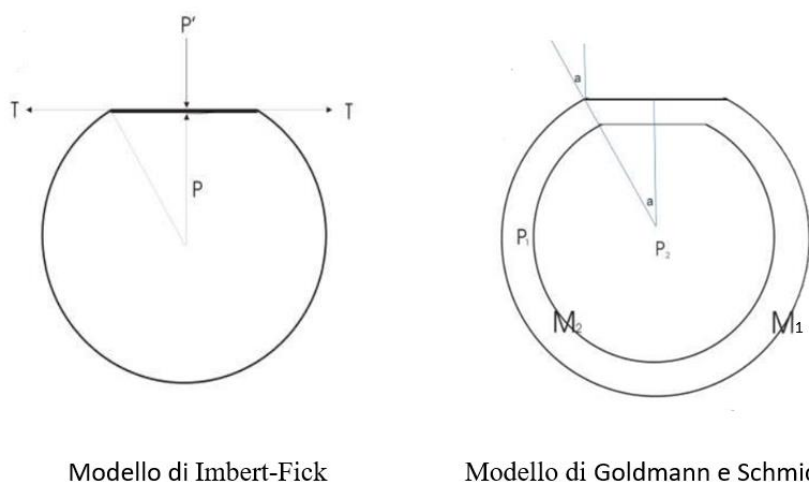


Figura 1.2: Modello di Imbert-Fick confrontato con il modello di Goldmann e Schmidt [28]

Nella GAT la cornea, durante la misurazione della PIO, è appiattita per mezzo del contatto con una testina bi-prismatica, illuminata con una luce blu cobalto. È necessaria l'applicazione di anestesia topica e di fluoresceina nel film lacrimale. La PIO può essere letta direttamente sul dispositivo, a meno di un fattore moltiplicativo pari a 10 (0,1 g di peso equivalgono a 1 mmHg di PIO), quando i margini dei due menischi di fluoresceina visualizzati da ciascun prisma vengono in contatto, come mostrato in figura 1.3, regolando opportunamente la forza con l'aplanometro. Questo tipo di misurazione fornisce una media della PIO diastolica e sistolica. Il tonometro di Perkins è una versione portatile della GAT (utilizza la stessa punta) che permette misurazioni sia in posizione supina che eretta. È dotato di batteria che ne permette l'uso durante l'acquisizione delle curve tonometriche [29]. Negli ultimi anni nella pratica clinica viene usata anche la tonometria non-contact (NCT) o tonometria a soffio. Sfrutta il principio della GAT ma l'apice corneale viene deformato per mezzo di un getto d'aria pulsato. La misurazione avviene nell'istante in cui la forza del getto d'aria è tale da dare l'appianazione e la durata è valutata con fotocellule. I vantaggi includono la velocità, la non necessità di anestesia topica e l'assenza di contatto diretto con l'occhio (si evitano eventuali infezioni oculari). Di contro, servono più misurazioni per avere una PIO attendibile e priva di artefatti dovuti alle caratteristiche corneali o ad eventi quali il respiro, il battito cardiaco o il movimento palpebrale. L'Ocular Response Analyser (ORA) effettua due misurazioni durante l'appianazione senza contatto: una mentre la cornea si muove verso l'interno spinta dal soffio e l'altra quando ritorna alla posizione originaria. La differenza delle due misure (isteresi) è un indicatore dello smorzamento viscoelastico del tessuto corneale. Il Tonometro a soffio d'aria Corvis ST è combinato con camera Scheimpflug ad alta velocità che registra la deformazione corneale durante l'esame. Fornisce due misure di PIO: una senza e una con fattore correttivo che tiene conto dello spessore corneale, dell'età del paziente e della risposta biomeccanica della cornea registrata. Nei pazienti pediatrici si usa il Rebound Tonometry (ICare) la cui misurazione si basa sul movimento di rimbalzo di una sonda leggera che impatta contro la cornea. Più elevato è il valore della PIO, minore è la durata del contatto e maggiore il rimbalzo della sonda sulla cornea e viceversa [10].

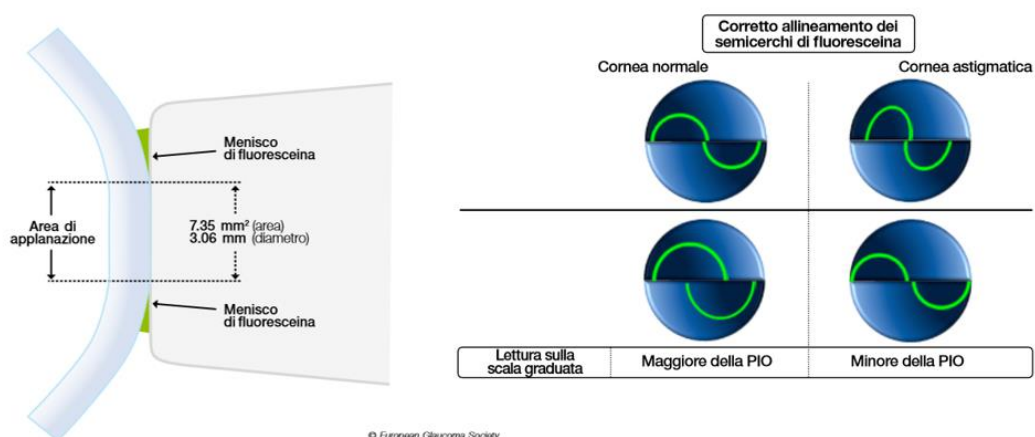


Figura 1.3: Contatto prisma-cornea durante misurazione della PIO con GAT (sinistra) e allineamento dei menischi di fluoresceina per effettuare corretta lettura sulla scala graduata (destra) [10]

- Tonografia

Per avere informazioni sulle capacità di deflusso del sistema trabecolare vengono registrati i valori di PIO mantenendo sugli occhi, per un determinato lasso di tempo, un tonometro ad indentazione. Nei pazienti non glaucomatosi il peso del tonometro favorisce il deflusso dell'UA e quindi si osservano nel tempo valori di PIO via via più bassi. La facilità di deflusso (C) è derivata dalla formula $C = F / (PIO - P_v)$, dove F è il volume di UA prodotto, PIO è la pressione intraoculare e P_v è la pressione nelle vene episclerali. Un valore di $C < 0.12$ è un campanello d'allarme che indica l'alta probabilità di dover formulare una diagnosi di glaucoma [17].

- Oftalmoscopia

L'oftalmoscopia è utilizzata nell'analisi delle alterazioni morfologiche e funzionali del nervo ottico e delle fibre ganglionari retiniche. Nei pazienti glaucomatosi, infatti, osservando il fondo oculare si notano: una progressiva diminuzione della rima neurale della papilla e un aumento dell'escavazione conseguenti all'atrofia delle CGR. L'assottigliamento progressivo del bordo neuroretinico può manifestarsi diffusamente, localizzato (notch) oppure come combinazione dei due aspetti ed è spesso accompagnato a cambiamenti dei vasi papillari che assumono una conformazione "a baionetta" [10]. È particolarmente difficile constatare questo tipo di alterazioni attraverso singole osservazioni soprattutto in fasi non avanzate della malattia glaucomatosa; quindi, sono state sviluppate tecniche di imaging che permettono di confrontare automaticamente osservazioni oftalmoscopiche diverse al fine di valutare la progressione della neuropatia. I parametri numerici utilizzati per cercare di standardizzare i criteri diagnostici sono dei rapporti adimensionali tra misure del diametro dell'escavazione e dell'intero disco ottico (cup/disc) e tra la superficie del disco ottico e della neurorima (disc/rim). Un elevato rapporto Cup/Disc (> 0.5) può rappresentare un segno di danno glaucomatoso [10], [17].

- Esame dello strato delle fibre nervose retiniche (RNFL)

L'osservazione biomicroscopica con luce rossopriva, fotografie con filtro blu o l'oftalmoscopia scanning laser ad argon blu-verde sono indispensabili per osservare le più precoci alterazioni a carico delle fibre ganglionari nelle prime fasi della malattia glaucomatosa. Normalmente i fasci di fibre nervose appaiono disposti attorno alla papilla come strie argenteo-argentee. La presenza di difetti localizzati (a cuneo e a fessura) e una perdita di luminosità e densità delle strie sono indice di un assottigliamento generalizzato delle RNFL e segno di alterazioni indotti dal rimodellamento glaucomatoso [10]. Lo spessore delle RNFL in corrispondenza dell'area peripapillare può essere misurato attraverso analizzatori digitali o con la polarimetria scanning laser che effettua una scansione circolare del nervo ottico. Le misure degli spessori calcolati in 16 settori angolari di $22,5^\circ$ ciascuno sono rappresentate su un grafico bidimensionale. Il rapporto tra spessore dei quadranti superiori e inferiori o tra ottante supero-temporale ed infero-temporale potrebbe rappresentare un indice di screening veloce per il glaucoma. L'escavazione della papilla e lo spessore delle RNFL possono essere valutate con la tomografia a coerenza ottica (OCT). Questa tecnica che si basa sull'interferometria e su una sorgente IR per acquisire sezioni tomografiche dei tessuti intraoculari è usata per quantificare il peggioramento della malattia e misurarne la

velocità di progressione. Scansioni longitudinali permettono di ottenere sezioni cilindriche della retina di diametro di circa 3,4 mm intorno al nervo ottico che, rappresentate su un piano, permettono la valutazione morfologica complessiva o per singolo quadrante delle strutture di interesse [16].

- Perimetria

L'esame del campo visivo (CV) è essenziale nella diagnosi e nella gestione del glaucoma per valutare l'estensione, la sua stabilità o progressione del danno oculare. Il CV è definito come l'insieme dei punti che simultaneamente proiettano sulla retina visiva stimoli sovraliminali, ovvero, la porzione di spazio che un occhio è in grado di percepire in un singolo istante [16]. È funzione della soglia minima di percezione dello stimolo nelle diverse porzioni della retina ed influenzato dal grado di luminosità ambientale e dall'adattamento del forame pupillare. Il limite tra lo spazio in cui uno stimolo risulta visibile e l'area in cui esso non è percepito si definisce isoptera. Con la perimetria cinetica si cercano i punti sensibili ad un determinato stimolo (fisso ad intensità variabile) mentre con quella statica si vuole individuare lo stimolo minimo percepito, in un determinato punto, da un soggetto che mantiene lo sguardo fisso sul centro di una cupola con luminosità di fondo fissa su cui viene proiettato uno stimolo che si muove dalla periferia verso il centro. Lo standard diagnostico di riferimento è la perimetria automatica computerizzata. Attraverso un esame perimetrico statico vengono determinati una serie di punti retinici con soglia luminosa minima. Le informazioni ottenute dall'esame vengono confrontate con campioni normali per fascia di età e presentate sotto forma di mappe numeriche/in scala dei grigi o grafici che classificano i parametri acquisiti in: "normali", "borderline" e "fuori dai limiti normali". Artefatti di acquisizione ed errori di valutazione sono più comuni in pazienti miopi [10], [17], [31], [32].

- Gonioscopia

La gonioscopia è un esame essenziale nella valutazione dei pazienti con glaucoma sospetto o conclamato. Ha lo scopo di esaminare l'angolo iridocorneale in cui il fluido acquoso ha accesso alle vie di drenaggio ed è basato sull'identificazione dei punti di repere angolari. L'angolo della camera anteriore non può essere visualizzato direttamente attraverso la cornea intatta perché la luce passando da un mezzo con un indice di rifrazione più alto a uno con un indice di rifrazione più basso subisce una riflessione interna totale ($n_1=1.50$ e $n_2=1.37$ da cui segue un angolo critico di 46° per l'interfaccia film lacrimale-aria). Utilizzando una goniolente, durante un esame in biomicroscopia, con indice di rifrazione simile a quello della cornea si elimina la riflessione interna totale e si sostituisce l'interfaccia film lacrimale-aria con l'interfaccia film lacrimale-goniolente come mostrato in figura 1.4 [32], [33]. Le lenti, definite anche gonioscopi, si differenziano in dirette e indirette speculari (uno specchio posto all'interno della lente fornisce un'immagine speculare dell'angolo camerulare). L'utilizzo di una lente a contatto diretta di Koepe (necessario l'uso di gel per avere un indice di rifrazione adatto e colmare lo spazio tra lente e cornea), Barkan, Layden (per neonati), Worst o Swan-Jacob permette di poter effettuare una gonioscopia diretta senza utilizzo della lampada a fessura. Le lenti gonioscopiche indirette più comuni sono le seguenti: Posner, Zeiss, Sussman, Khaw a 4 specchi (gel non

necessario) o di Goldman (da 1 a 4 specchi dove è necessario l'uso di gel). La gonioscopia dinamica eseguita applicando una pressione sulla cornea con una lente per indentazione permette di visualizzare la rientranza angolare solo nel caso in cui non vi siano zone di adesione tra l'iride e il trabecolato.

Un momento fondamentale dell'esame gonioscopico è la determinazione dell'ampiezza dell'angolo, valutabile individuando i seguenti punti di repere o strutture:

- **Linea di Schwalbe:** una condensazione di collagene nella parte terminale della membrana di Descemet, segna il confine tra il trabecolato e l'endotelio corneale, ed appare come una sottile linea traslucida.
- **Trabecolato:** si estende dalla linea di Schwalbe fino allo sperone sclerale ed ha una larghezza media di 600 μm . La parte anteriore, non funzionale, di colore biancastro si fonde con quella posteriore, funzionale e pigmentata (aspetto traslucido grigio-blu).
- **Canale di Schlemm:** si trova anteriormente allo sperone sclerale ed ha l'aspetto di una linea scura non molto distinguibile. Talvolta può essere visualizzato se contenente sangue.
- **Sperone sclerale:** struttura di colore bianco che ingiallisce con l'età, localizzata tra il trabecolato pigmentato ed il corpo ciliare, rappresenta il sito di inserzione del muscolo longitudinale del corpo ciliare.
- **Banda ciliare e radice iridea:** il corpo ciliare appare come una banda rosa, marrone opaco o grigio dietro lo sperone sclerale. L'inserzione dell'iride, comunemente situata sulla faccia anteriore del corpo ciliare, ne determina la larghezza. Piccole estensioni della superficie anteriore dell'iride possono ricoprire il corpo ciliare ed inserirsi a livello dello sperone sclerale.
- **Pigmentazione:** si trova soprattutto sulla parte posteriore del trabecolato. È visibile negli adulti e l'estensione può essere altamente variabile.
- **Vasi sanguigni:** i vasi non patologici assumono un orientamento radiale o circonferenziale, un aspetto poco ramificato e non si estendono oltre lo sperone sclerale. Al contrario, i vasi patologici sono più sottili, con un orientamento disordinato e possono attraversare lo sperone sclerale.

Nel tempo sono stati numerosi gli schemi classificativi proposti per valutare al meglio l'ampiezza angolare. Quello di Shaffer, ad esempio, distingue 5 gradi di ampiezza: grado 0 quando l'angolo è chiuso e non permette l'osservazione di nessuna struttura, grado 1 se si osserva la linea di Schwalbe, grado 2 quando è visibile il trabecolato, grado 3 quando si vede anche lo sperone sclerale e grado 4 quando sono visibili tutte le strutture. La classificazione proposta da Spaeth risulta più complessa ma completa poiché tiene conto oltre che dell'ampiezza in gradi dell'angolo (0° - 10° , 10° - 20° , 20° - 30° , 30° - 40° e $>40^\circ$) anche della sede dell'inserzione dell'iride e del profilo dell'iride.

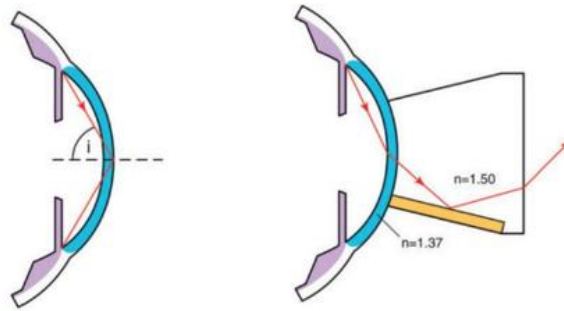


Figura 1.4: Riflessione interna totale della luce che esce dalla cornea ed effetto sull'angolo critico di una goniolente [33]

1.6 Strategie terapeutiche farmacologiche

Le terapie proposte alle persone affette da glaucoma hanno come obiettivo quello di promuovere il benessere e la qualità di vita poiché spesso correlate alla funzione residua visiva. Un aspetto da valutare è l'impatto psicologico del paziente, che deve acquisire consapevolezza di essere affetto da una malattia cronica progressiva, al fine di avere una maggiore aderenza alle strategie terapeutiche. L'unico approccio che abbia dimostrato una buona efficacia nel preservare la funzione visiva è l'abbassamento della PIO [10]. L'effetto ipotonizzante viene ricercato attraverso la somministrazione di farmaci topici che hanno un effetto sulla regolazione della produzione e del deflusso dell'UA da parte del sistema nervoso autonomo.

Gli agenti miotici parasimpaticomimetici, di cui fa parte la pilocarpina, mirano a facilitare il deflusso dell'UA inducendo l'aumento degli spazi intertrabecolari grazie alla contrazione del muscolo ciliare. La pilocarpina, indicata per la cura di pazienti con GAA cronico, si trova nei preparati oftalmici in concentrazione dall'1 al 4% spesso in combinazione con β -bloccanti. A causa della durata d'azione di circa 6 ore richiede almeno 3-4 somministrazioni giornaliere. I simpaticomimetici alfa e beta stimolanti, come l'adrenalina, grazie alla stimolazione simultanea α e β -adrenergica, provocano contemporaneamente riduzione della produzione e aumento del deflusso dell'UA sia a livello uveosclerale che trabecolare. La midriasi, derivante dall'effetto α , ne controindica la somministrazione nei pazienti con angolo stretto potenzialmente occludibile. Le imidazoline sono utilizzate perché, grazie all'affinità selettiva per il recettore α -2 adrenergico, inducono una minor produzione di UA ed uno spiccato effetto ipotonizzante. Gli α -simpaticolitici come la timoxamina e il dapiprazolo, inibendo l'azione del muscolo dilatatore dell'iride quando somministrati per via topica in camera anteriore, sono spesso utilizzati per la prevenzione del GAC. Il blocco della stimolazione adrenergica sui recettori β del corpo ciliare provoca una minore produzione di UA. I farmaci β -bloccanti, a volte in associazione con altre classi di farmaci, rappresentano il trattamento più scelto in tutte le forme di glaucoma ed in particolare nel GAA. Le sulfonamidi inibiscono l'anidrasi carbonica che catalizza la reazione $H_2O + CO_2 = HCO_3^- + H^+$, fondamentale nella produzione di UA. Le molecole inibitrici più utilizzate in clinica sono: Acetazolamide, Diclofenamide, Metazolamide ed Etossizolamide. Sono particolarmente indicate nel GAC in fase acuta ma molto efficaci per qualsiasi tipo di ipertono potendo essere associate a qualsiasi altra classe di ipotonizzanti. Analoghi delle prostaglandine, acidi deboli normalmente non in grado di attraversare la cornea, necessitano di esterificazione con metile, etile o isopropile per poter assolvere all'aumento del deflusso uveo-sclerale. Aumentando il potere osmotico del sangue, i vari tessuti vanno incontro

a un processo di richiamo di acqua. Questo fenomeno nell'occhio provoca disidratazione dell'umore vitreo e conseguente rapida caduta di PIO, senza intervenire sulla produzione o deflusso dell'UA. Gli osmotici (glicerolo, mannitolo, urea, isosorbide) vengono impiegati soprattutto nei casi acuti di GAC poiché risolvono il blocco pupillare e/o la chiusura dell'angolo.

Colliri topici, unguenti oftalmici e gocce in gel sono i metodi di somministrazione di farmaci più utilizzati nella gestione del glaucoma poiché minimamente invasivi, comodi, sicuri ma non sempre efficaci. Le principali limitazioni di questo tipo di formulazioni sono: dosaggio limitato e necessità di somministrazione multipla che diminuisce la speranza di aderenza nel lungo periodo, modesta biodisponibilità, scarsa compliance e ridotta capacità di penetrazione causata dal limitato flusso sanguigno nei tessuti corneali [34], [35]. La perdita della biodisponibilità di un farmaco dopo l'instillazione rappresenta un vincolo importante nell'impostare un piano terapeutico. Bisogna tenere in conto, infatti, che subito dopo la somministrazione il tasso di turnover del fluido lacrimale ($\sim 1 \mu\text{L}/\text{min}$) rimuove gran parte del medicamento attraverso i dotti nasolacrimali. Sulla permeabilità del farmaco agiscono lo strato diversificato di cellule epiteliali colonnari e squamose, così come le giunzioni strette intercellulari che costituiscono la barriera corneale primaria. Ulteriori ostacoli che incontra il farmaco prima di raggiungere il target sono: le barriere oculari del sacco lacrimale, dove attraverso la parete vascolarizzata viene eliminato dalla circolazione sanguigna circa il 95% del quantitativo istillato, le barriere emato-oculari (barriera emato-acquosa e barriera emato-retinica) ed infine la barriera proteica di efflusso, che principalmente per mezzo della glicoproteina P, impedisce l'ingresso di molecole idrofile e lipofile nelle cellule epiteliali congiuntivali, ciliari non pigmentate e endoteliali della retina [35].

Aumentando il tempo di contatto della terapia topica con l'occhio migliora la biodisponibilità dei farmaci, per questo motivo, spesso vengono incorporati additivi nelle formulazioni, come la carbossimetilcellulosa, per aumentarne la viscosità, la residenza precorneale e la permeazione oculare. Un altro approccio prevede l'uso di sistemi bifasici immiscibili (olio in acqua (o/w) e acqua in olio (w/o)) usati principalmente per migliorare la solubilità, la dissoluzione e l'assorbimento del farmaco. Le emulsioni o/w e le dispersioni di farmaco in un mezzo o solvente acquoso sono ampiamente utilizzate per la somministrazione di farmaci idrofobici. È molto importante regolare la dimensione e la morfologia superficiale delle particelle per non inficiare l'efficacia del farmaco o creare irritazioni oculari.

Gli unguenti costituiti da una miscela di olio minerale, vaselina e paraffina che, fondendo alla temperatura fisiologica dell'occhio (34°C), garantiscono un miglior tempo di contatto sulla superficie oculare rispetto al farmaco tal quale, di contro però, possono essere soggetti a dosaggio impreciso o causare dolore e visione offuscata.

Per diminuire la frequenza di somministrazione, ove possibile, vengono utilizzate le iniezioni perioculari che, sfruttando le caratteristiche permeabili della membrana sottocongiuntivale, consentono il rilascio continuo e prolungato di farmaco nel segmento posteriore, normalmente non facilmente accessibile [16], [36].

Negli ultimi decenni sono state sviluppate numerose soluzioni che, utilizzando nanocarrier, permettono di avere formulazioni con profili di rilascio prolungato del farmaco, tempo di permanenza tissutale elevato senza innescare reazioni immunogeniche, sensibilizzanti o irritanti. Attraverso il controllo della dimensione, della struttura, delle caratteristiche chimico-

fisiche e del materiale più appropriato con cui effettuare il rilascio di farmaco si riesce infatti ad ottenere una cinetica controllata e un targeting mirato. I nanovettori più utilizzati nella cura del glaucoma sono: nanoparticelle, idrogel, inserti nanofibrosi e lenti a contatto per il lento rilascio di farmaco.

Le nanoparticelle inorganiche hanno riscosso molto successo per la facilità di produzione, la bassa citotossicità, elevata capacità di incapsulamento e per la possibilità di poterne facilmente funzionalizzare la superficie. Liao et al.[37], ad esempio, hanno utilizzato le nanoparticelle di silice mesoporosa funzionalizzate con gelatina per il rilascio prolungato di pilocarpina. La PIO è stata abbassata sfruttando la sovraespressione della metalloproteinasi-2 (MMP-2) nella camera anteriore che, provocando la degradazione della gelatina, ha permesso il rilascio di farmaco in camera [34]. Nanoparticelle di ceria cave funzionalizzate superficialmente con chitosano e ZM241385 sono state sviluppate da Luo et al. [38] per la somministrazione mirata della pilocarpina nel corpo ciliare. Superando le giunzioni strette epiteliali e mostrando un tempo di rilascio 42 volte superiore rispetto ai colliri normalmente utilizzati, un maggior decremento della PIO e una soppressione delle citochine infiammatorie, le nanoparticelle a base di ceria hanno dimostrato essere uno dei candidati migliori da impiegare nelle cure del glaucoma.

Anche i polimeri sono ampiamente utilizzati come vettori nella somministrazione di farmaci poiché impiegabili nella realizzazione di micro e nanoparticelle, scaffold, membrane, nanofibre elettrofilate e idrogel. Agban et al.[39] hanno mostrato che film di collagene reticolato con nanoparticelle di ossido di metallo possono promuovere il rilascio prolungato di pilocarpina mentre Shokry et al.[40] attraverso nanoparticelle di gelatina caricate con Timololo Maleato hanno ottenuto una riduzione maggiore di PIO rispetto alla formulazione commerciale. Il Chitosano, un altro polimero naturale biodegradabile, bioattivo, citocompatibile mostrando una carica superficiale positiva può legarsi attraverso interazioni elettrostatiche con i mucini corneali che hanno carica negativa e favorire quindi una maggiore ritenzione del farmaco sulla superficie oculare. Per questa caratteristica il chitosano è spesso impiegato come nanocarrier al fine di promuovere un aumento della biodisponibilità del farmaco cui fa da vettore.

Anche i polimeri sintetici PCL, PLA e PLGA trovano ampio spazio nella sintesi e sviluppo di sistemi di veicolazione oculare. Preferiti, a volte, a quelli naturali per i costi di produzione contenuti, la biocompatibilità ma soprattutto per la biodegradabilità controllabile possono essere processati attraverso molte tecniche di fabbricazione. Pan et al. [41] utilizzando l'elettrospray coassiale hanno sintetizzato nanoparticelle di PLGA per la co-somministrazione di desametasone e melatonina, con un'efficacia di incapsulamento dell'85% e un'ottima efficacia di penetrazione retinica, utili nel ridurre la PIO. Lee et al. [42] hanno usato la tecnica della doppia emulsione olio/acqua/olio per incapsulare la pilocarpina in nanoparticelle di PCL ed ottenere un rilascio di farmaco di 6 settimane.

Gli idrogel hanno suscitato un notevole interesse per la somministrazione controllata di farmaci grazie alla loro conformazione porosa che fornisce spazio sufficiente per l'incapsulamento di molecole terapeutiche, la suscettibilità a stimoli quali pH, temperatura ed enzimi e la possibilità di poterne regolare la resistenza meccanica intervenendo sul peso molecolare, sulla concentrazione di polimero o sul tipo di reticolazione (fisica, ionica e chimica). Fedorchak et al.[43] ad esempio hanno sfruttato un approccio combinato per formulare un collirio a base di gel termoresponsivo e microsfeere di polimero contenenti farmaco che rappresenta un metodo

di rilascio prolungato di brimonidina che può essere somministrato come un medicamento topico tradizionale. Behtaj, et al.[44] hanno studiato il ruolo di uno scaffold con struttura allineata di poli (glicerolo sebacato) (PGS)/poli(ϵ -caprolattone) (PCL) sulla differenziazione di hESC in cellule simili a RGC per possibili impieghi nella rigenerazione della retina. Come è noto, infatti durante la malattia glaucomatosa la degenerazione delle CGR, che hanno scarse capacità rigenerative, portano porta lentamente il paziente verso la cecità. Anche se sono necessari ulteriori studi ed approfondimenti sulla possibile integrazione delle RGC differenziate nelle retine dei pazienti glaucomatosi a scopo rigenerativo, l'aver osservato un la differenziazione delle hESC in RGC dopo sette giorni fa ben sperare sulla possibilità di utilizzare scaffold polimerici in grado di promuovere contemporaneamente la differenziazione e dare supporto strutturale alle cellule da trapiantare in vivo.

Riuscire ad ottenere un rilascio controllato di farmaco utilizzando lenti a contatto è una sfida ancora aperta. Ciolino et al. [45] hanno sviluppato una lente a contatto per la somministrazione prolungata di latanoprost. Incapsulando film di latanoprost-poli (acido lattico-co-glicolico) in metafilcon e polimerizzando con luce ultravioletta, sono riusciti ad avere per un mese concentrazioni di latanoprost nell'UA paragonabili a quelle ottenute con la soluzione topica dello stesso farmaco.

Attualmente la ricerca sta cercando soluzioni in grado di prevenire direttamente il danno neuronale. Una molecola neuroprotettiva promettente e registrata per la gestione del glaucoma in quattro paesi europei è la citicolina somministrata in soluzione orale, occasionalmente è usato anche il Ginkgo biloba [10]. Le strategie di neuroprotezione IOP-indipendenti hanno però mostrato molte limitazioni traslazionali, nonostante siano ben rispondenti nei modelli animali [36]. Servono ancora numerosi sforzi per comprendere e gestire efficacemente i numerosi fattori coinvolti nel rimodellamento glaucomatoso come, ad esempio, le interazioni neuroniglia-vasi sanguigni e l'attivazione del sistema immunitario [1] prima di poter ottenere strategie neuroprotettive efficaci e sicure nell'uomo.

Contemporaneamente all'espansione della disponibilità di opzioni farmacologiche, che offrono vantaggi quali la flessibilità e la reversibilità del piano terapeutico, sempre più spesso la gestione del glaucoma viene effettuata attraverso chirurgia laser o microinvasiva. Le tecniche chirurgiche, anche se necessitano di una verifica di efficacia nel lungo periodo, permettono infatti di superare lo scoglio dell'aderenza ai trattamenti topici che altrimenti accompagnerebbero il paziente durante tutta la vita.

1.7 Chirurgia laser

Esistono diversi tipi di trattamenti laser ma tutti hanno lo scopo di controllare la PIO riducendo o eliminando l'utilizzo di terapie farmacologiche oppure di ritardare il trattamento chirurgico [46].

- Iridotomia periferica laser (laser peripheral iridotomy - LPI)

Indicata nei casi di GAC o nei pazienti con sospetto meccanismo di blocco pupillare o iride a plateau consiste nel praticare un foro a tutto spessore, con il laser Nd:YAG, nello stroma irideo di dimensione tale da garantirne la pervietà dell'UA dalla camera posteriore verso quella anteriore anche in presenza di edema del tessuto irideo, di proliferazione dell'epitelio

pigmentato e di midriasi. Durante la procedura sulla cornea viene una lente a contatto per iridotomia che permette di concentrare il raggio laser e dissiparne il calore generato. Tra lente e superficie oculare è posto un gel di metilcellulosa. Durante la prima fase di trattamento di durata di esposizione 0.05 sec viene impiegata una potenza (bassa) che varia nel range 90-250 mW successivamente impostata a 700mW per 0.1 sec. Durante tutto il processo il diametro dello spot è di 50 μ m. L'aumento transitorio della PIO è la complicanza postoperatoria più frequente per questo è preferibile somministrare al paziente α 2-agonisti 1 ora prima e subito dopo la procedura [10].

- Trabeculoplastica laser

È una tecnica indicata nei casi di GPAA, glaucoma pseudoesfoliativo, pigmentario e nei casi di ipertensione oculare ad alto rischio ed interessa l'angolo iridocorneale. Gli spot laser, in un numero variabile da 50 a 100, distribuiti su 360° gradi (negli occhi con rete trabecolare molto pigmentata, può essere deciso di eseguire il trattamento su 180°), sono indirizzati mediante lenti angolate gonioscopiche nella giunzione tra la parte pigmentata e quella non pigmentata del trabecolato. Diversi laser (Q-switched, short pulsed, Nd:YAG) offrendo la possibilità di trattare selettivamente le cellule pigmentate del trabecolato (Selective Laser Trabeculoplasty – SLT) vengono preferiti al laser argon ad onda continua (verde o blu/verde), molto usato in passato per i trattamenti di trabeculoplastica (argon laser trabeculoplastica, ALT). Le due tecniche sono ugualmente efficaci e sicure come primo trattamento nel ridurre la IOP nei casi di GAA. Possibili complicanze sono aumento della PIO e infiammazione [10], [46].

- Iridoplastica periferica con laser termico (Thermal laser peripheral iridoplasty - TLPI)

La tecnica TLPI prevede che spot laser disposti ad anello nell'iride periferica determinino 20-24 spot su 360° (intervallo pari a 2 diametri dello spot) di ampie dimensioni (200-500 micron) in grado di contrarre lo stroma irideo e allargare l'angolo irido-corneale. Questa tecnica viene applicata con lo scopo di ridurre il rischio di chiusura d'angolo nei pazienti con iride a plateau, in pazienti con GAC non responsivi al trattamento medico e nei quali l'LPI non può essere effettuata ma risulta poco efficace nella riduzione della PIO [10], [46].

1.8 Chirurgia incisionale

La chirurgia incisionale è l'ultima opzione da prendere in considerazione solo quando sia la terapia medica e/o il trattamento laser hanno dimostrato non essere sufficienti ad evitare la perdita della funzione visiva. Le tecniche di chirurgia filtrante mirano ad ottenere una normalizzazione duratura della PIO attraverso la creazione di una via di deflusso dell'UA nello spazio episclerale/sottocongiuntivale [10], [47].

Tra le tecniche penetranti si annoverano:

- Trabeculectomia

L'approccio chirurgico più impiegato per la gestione del GAA non responsivo alle cure o ai trattamenti laser è la trabeculectomia. Una piccola porzione (circa 1 x 3 mm) di tessuto sclero-corneale viene asportato per consentire all'UA di filtrare all'esterno dell'occhio e di raccogliersi al di sotto della congiuntiva, dove forma la bozza filtrante. Per impedire la

fuoriuscita di una quantità eccessiva di UA la via di deflusso viene ricoperta con uno sportello sclerale, inoltre, al di sopra dell'area di filtrazione viene suturata la congiuntiva.

- **Trabeculotomia e goniectomia**

La trabeculotomia ab externo con ferri chirurgici o suture è un intervento senza filtrazione esterna che mira all'ipotonizzazione oculare per riattivazione del corretto deflusso di UA nei dotti collettori. Lo scollamento della congiuntiva, l'incisione della sclera, l'individuazione del canale di Schlemm ed il suo incanalamento sono i passaggi caratterizzanti di questa tecnica. Nella goniectomia, tecnica che prevede la resezione delle sinechie a livello dell'angolo irido-corneale per favorire la fisiologica circolazione dell'UA [48], la visualizzazione del recesso angolare e del trabecolato attraverso la camera anteriore è permesso mediante lente gonioscopica [49]. Queste due tecniche hanno maggiore efficacia nel trattare il glaucoma congenito e pediatrico con cornea trasparente [10].

Esistono anche tecniche non penetranti che si basano sulla formazione di una camera intrasclerale di decompressione, separata dalla camera anteriore attraverso una membrana trabeculodescemetica. L' UA passa per percolazione dalla camera anteriore nello spazio intrasclerale attraverso la membrana. Non prevedendo l'apertura del bulbo oculare risentono meno del rischio di infezioni e cataratta ed evitano gli improvvisi cali di pressione tipici della trabeculotomia [50].

- **Sclerectomia profonda**

Prevede la preparazione di uno sportello sclerale profondo per eseguire l'asportazione della parete esterna del canale di Schlemm. L'UA dopo essere stato percolato attraverso la membrana descemetica e raccolto nella camera intrasclerale fuoriesce dallo sportello sclerale superficiale e riassorbito dalle vene episclerali.

1.9 La chirurgia del glaucoma minimamente invasiva (MIGS)

Sotto la definizione di MIGS vanno un'ampia gamma di tecniche chirurgiche e dispositivi impiantabili che mirano a ridurre la PIO e superare i limiti degli approcci chirurgici tradizionali per il glaucoma [51].

Saheb e Ahmed, nel 2012, hanno enunciato le cinque proprietà caratterizzanti della MIGS [52], [53]:

1. approccio ab interno (incisione corneale che risparmia la congiuntiva);
2. procedura minimamente invasiva/traumatica sul tessuto bersaglio;
3. efficacia di riduzione della PIO tale da giustificare l'approccio;
4. elevato profilo di sicurezza che eviti gravi complicanze rispetto ad altri interventi chirurgici sul glaucoma;
5. un rapido recupero postoperatorio con un impatto minimo sulla qualità della vita del paziente.

Nel 2014 l'American Glaucoma Society e la Food and Drug Administration (FDA) statunitense hanno ribadito che “la MIGS è caratterizzata dall'impianto di un dispositivo chirurgico destinato ad abbassare la PIO tramite un meccanismo di deflusso con un approccio ab interno o ab externo, associato a una dissezione sclerale minima o nulla” [54], [55].

Qidawi et al. nel 2022 hanno introdotto il termine minimally invasive bleb surgery (MIBS) ovvero chirurgia della bozza minimamente invasiva, per differenziare approcci adatti per pazienti con glaucoma da moderato a grave e un alto rischio di progressione nonostante il trattamento farmacologico dalla MIGS tradizionale destinata invece a soggetti affetti da glaucoma da lieve a moderato non responsivo alle terapie farmacologiche e chirurgiche [56]. Standardizzando le tecniche chirurgiche (combinazione di MIGS e chirurgia incisionale tradizionale) con l'approccio MIBS viene ridotto al minimo il rischio di ipotonia postoperatoria e si garantisce la formazione di vescicole posteriori meglio tollerate e meno soggette a rischio infiammazione. Nell'ultimo decennio la ricerca di un approccio efficace e sicuro per trattare i pazienti glaucomatosi che necessitano di un approccio chirurgico ha portato allo sviluppo di molti dispositivi. A seconda del meccanismo dell'azione con cui intendono raggiungere lo scopo ipotonizzante gli impianti MIGS possono migliorare o bypassare il deflusso di UA convenzionale o potenziare quello non convenzionale deflusso convenzionale. Sulla base della formazione della bozza filtrante gli impianti possono essere classificati come dipendenti o indipendenti dalla stessa [52].

- Impianti convenzionali per il glaucoma

Si dividono in dispositivi valvolati e non valvolati a seconda se prevedono la presenza o meno di un meccanismo valvolare per aiutare a prevenire l'ipotonia della prima fase post-operatoria. Tra gli impianti convenzionali si trovano gli impianti Molteno®, Baerveldt® e PAUL®, Ahmed® Glaucoma Valve e Ahmed® ClearPath.

- Impianti Molteno (Molteno Ophthalmic Ltd., Dunedin, New Zealand) sono una famiglia di dispositivi non valvolati che prevedono un approccio ab esterno (figura 1.5). Tra questi vi sono:
 - Molteno Single Plate: impianto costituito da un tubo in silicone (diametro interno=0.34 mm diametro esterno=0.64mm) collegato ad una piastra terminale in polipropilene (di superficie =133 mm²) facile da impiantare che permette un drenaggio veloce dell'UA aumentando lo spazio sottocongiuntivale/subtenone. Di contro, il tubo può andare incontro ad occlusione e non essendo valvolato può insorgere ipotonia post-operatoria per eccesso di drenaggio.
 - Molteno Double Plate: grazie all'area di drenaggio molto estesa permette un miglior controllo della PIO rispetto alla versione a piastra singola. Con l'aumentare dell'area del dispositivo aumenta anche il rischio di appiattimento della camera anteriore.
 - Molteno D1 e DR posseggono una piastra la cui parte superiore è divisa in due camere separate attraverso un sottile anello a forma di "V". La camera con area minore quando è coperta dalla capsula di Tenone riesce a regolare il flusso di UA nella bozza filtrante poiché sensibile alla pressione.
 - Molteno3® serie S è il più utilizzato poiché dotato di una placca episclerale più sottile e flessibile rispetto ai dispositivi della stessa linea è disponibile in due misure: 185 e 245 mm²

Molteno® Glaucoma Drainage Device

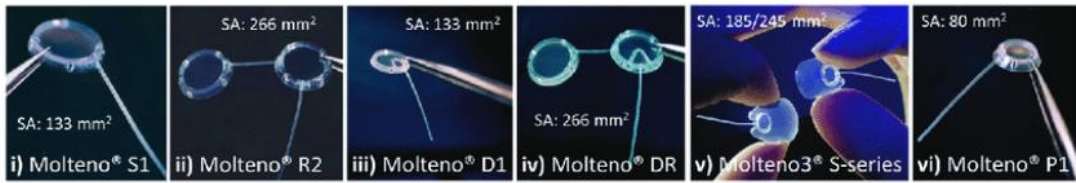


Figura 1.5: impianti Molteno (Molteno Ophthalmic Ltd., Dunedin, New Zealand)[57]

- Gli Impianti Baerveldt (Abbott Medical Optics Inc., Irvine, CA) sono stati progettati a singola piastra in silicone, morbida, flessibile e impregnata di bario, con una superficie maggiore di qualsiasi dispositivo di tipo Molteno, per facilitarne il posizionamento (viene inciso un solo quadrante dell'occhio) ed ottenere un maggiore controllo della PIO a lungo termine. Anche in questo caso la piastra disponibile in due misure: 350 mm² e 250 mm² (per soggetti con occhi piccoli) è collegata ad un tubo in silicone morbido come è possibile osservare in figura 1.6. Per limitare l'ipotonia post-impianto è stato sviluppato il dispositivo Baerveldt pars plana a gomito di Hoffman da impiantare nella cavità vitreale.

Baerveldt® Glaucoma Implant

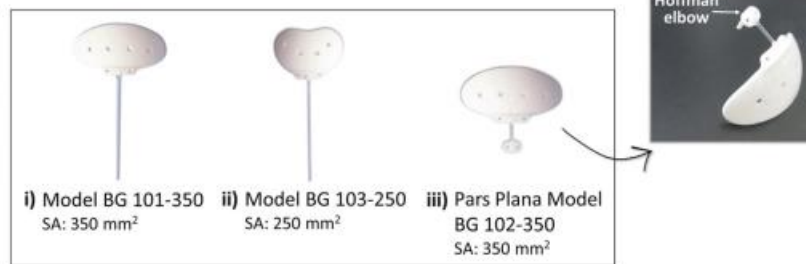


Figura 1.6: Impianti Baerveldt (Abbott Medical Optics Inc., Irvine, CA) [57]

- Impianto PAUL (Advanced Ophthalmic Innovations, Singapore, Repubblica di Singapore) in figura 1.7 è realizzato in silicone di grado medico e si distingue dagli altri dispositivi per il drenaggio nella gestione del glaucoma (GDD) per il piccolo lume del tubo (ID = 0,127 mm; OD = 0,467 mm) e l'ampia piastra terminale di 342 mm².

PAUL® Glaucoma Implant

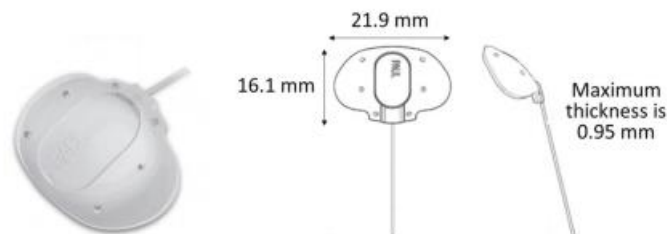


Figura 1.7: Impianto PAUL(Advanced Ophthalmic Innovations, Singapore, Repubblica di Singapore) [57]

- Ahmed Glaucoma Valve (figura 1.8 (a)) è un impianto costituito da: una piastra terminale di forma oblunga, un tubo di drenaggio (ID = 0,30 mm; OD = 0,63 mm) e un

meccanismo valvolare che implica la presenza di 2 membrane in elastomero siliconico pretensionate deformabili che si aprono se IOP è maggiore di 8 mmHg e rimangono chiuse al di sotto di questo valore per ridurre il rischio di ipotonia.

- Ahmed® ClearPath (figura 1.8 (b)) è un impianto senza valvola costituito da un tubo in silicone di grado medico (ID = 0,305 mm; OD = 0,635 mm) fissato a una piastra episclerale flessibile in silicone impregnato di bario. Esistono due modelli: CP250 (con superficie di 250 mm²) e CP350 (con superficie 350 mm²).

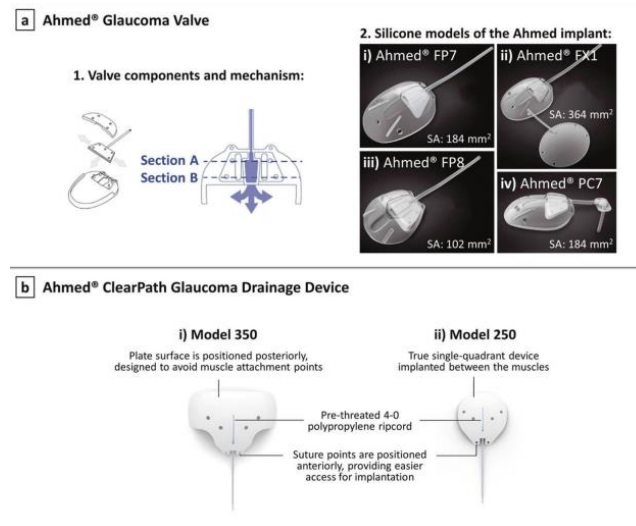


Figura 1.8: Dispositivo Ahmed Glaucoma Valve (a) e Ahmed® ClearPath (b)

- Dispositivi MIGS del canale di Schlemm

Vengono utilizzati per dirigere l'UA nel canale di Schlemm bypassando il reticolo trabecolare che viene ritenuto essere il sito che oppone maggiore resistenza al deflusso di UA. Attualmente in commercio vi sono i seguenti dispositivi MIGS del canale di Schlemm (figura 1.9):

- iStent® (Glaukos Inc., San Clemente, CA) è un impianto in titanio rivestito di eparina progettato con una forma di "L". Viene posizionato nel canale di Schlemm tramite un'incisione ab interno e utilizzando un apposito inseritore.
- L'impianto multiplo di iStent ha mostrato un effetto additivo sulla riduzione della PIO. Per questo motivo è stato sviluppato iStent inject® un dispositivo di forma conica sempre realizzato in titanio rivestito con eparina. Un particolare inseritore permette, con un singolo accesso di posizionare canale di Schlemm due dispositivi contemporaneamente.
- iStent inject® W è stato progettato con una flangia di diametro 360 µm (i vecchi modelli avevano diametro pari a 230 µm) per ottimizzare il posizionamento dello stent durante gli impianti.

- Hydrus® Microstent che ha ricevuto il marchio CE nel 2011 e l'approvazione della FDA nel 2018 è un'impalcatura in Nitinol (55% nichel-45% lega di titanio) lunga 8 mm che sostiene l'apertura l'aumento della sezione trasversale del canale di Schlemm fino a 5 volte il valore fisiologico. La particolare struttura è ricavata, con la tecnica di taglio al laser, da un tubo in nitinol per mezzo di un profilo brevettato che vede l'alternarsi di "creste" (per il supporto strutturale) e "finestre" (per migliorare il deflusso dell'umore acqueo).

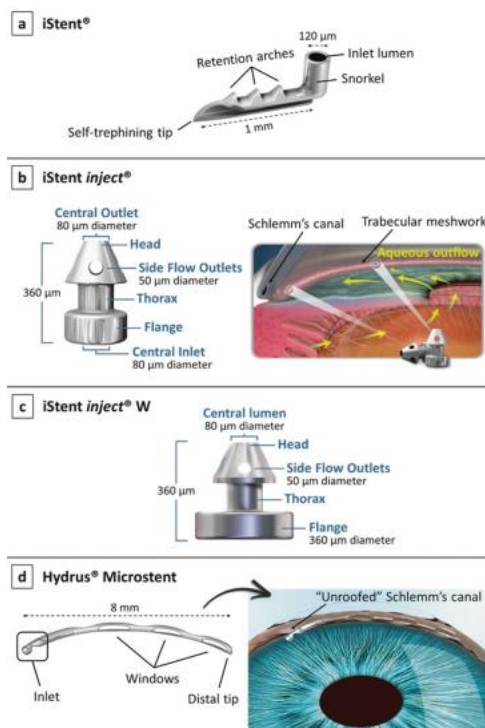


Figura 1.9: Dispositivi MIGS del canale di Schlemm: iStent® (Glaukos Inc., San Clemente, CA) (a), iStent inject® (b), iStent inject® W (c) e Hydrus® Microstent(d)

- Dispositivi per MIGS supracoroidali

I dispositivi per MIGS da impiantare nello spazio supracoroidale mirano a sfruttare la via di deflusso uveosclerale per perseguire lo scopo di controllo pressorio intraoculare. I principali GDD commerciali di questo tipo sono presentati in figura 1.10.

- Il micro-stent CyPass (Alcon, Fort Worth, Texas, USA) destinato ad essere impiantato nello spazio sopraciliare per mezzo di procedura ab interno è realizzato in poliimmide biocompatibile. Per favorire il deflusso di UA sono state realizzate delle fenestrature, di 76 µm di diametro, lungo tutta la lunghezza del dispositivo. Questo dispositivo nonostante abbia dimostrato buone caratteristiche ipotensive entro l'anno dall'impianto è stato ritirato dal mercato globale a causa di problemi di sicurezza.
- L' iStent SUPRA (Glaukos Corporation, California, USA), è un piccolo dispositivo curvo composto da polietersulfone (PES) e titanio e rivestito di eparina, nato come combinazione dei due diversi dispositivi iStent® sviluppati essere impiantati nel canale di Schlemm.

- Lo shunt in oro puro al 99,95% SOLX®(SOLX, Inc., Massachusetts, USA) necessita di impianto con incisione ab externo. Composto da due piastre d'oro saldate insieme su cui sono ricavati 19 microcanali (dieci chiusi e nove aperti). I fori praticati su entrambe le estremità del dispositivo consentono all'UA di fluire attraverso dalla camera anteriore allo spazio supracoroidale. Il chirurgo, se necessario, può controllare il deflusso dell'UA andando ad aprire con un laser i canali necessari a controllare la PIO nel decorso postoperatorio.
- STARflo (iStar Medical, Wavre, Belgium) è realizzato in elastomero siliconico STAR® (materiale che deriva da NuSil med-6215) e presenta una geometria multiporosa, a sfere cave, attentamente progettata per promuovere la biointegrazione con i tessuti ospitanti, ridurre l'incidenza di fibrosi e minimizzare le cicatrici, aumentando così la durata dell'impianto nel lungo termine.
- MINIject (iStar Medical, Wavre, Belgium) è un dispositivo in silicone medicale STAR® morbido, flessibile e non degradabile, lungo 5 mm di lunghezza e con sezione trasversale 1,1 mm x 0,6 mm, con un anello di colore verde posizionato a 0,25 mm dalla punta del dispositivo per facilitare il posizionamento dell'impianto che ha ottenuto la marcatura CE nel novembre 2021. Ogni MINIject contiene circa 180.000 pori cavi (2/3 dell'impianto) di diametro pari a 27 µm (sfere cave disposte in un modello di rete standardizzato) che mirano a ridurre l'incidenza di fibrosi post-impianto.

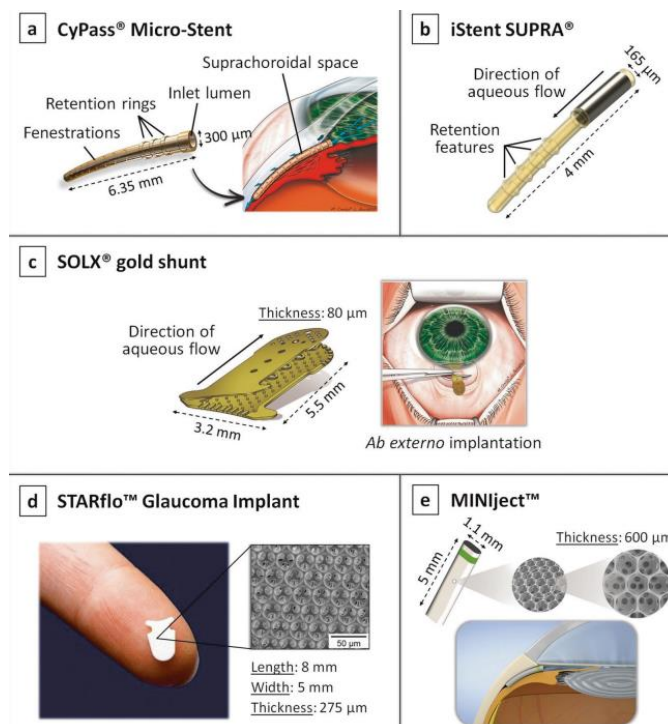


Figura 1.10: Dispositivi per MIGS supracoroidali: micro-stent CyPass (Alcon, Fort Worth, Texas, USA) (a), iStent SUPRA (Glaukos Corporation, California, USA) (b), SOLX® gold shunt (SOLX, Inc., Massachusetts, USA) (c), STARflo (iStar Medical, Wavre, Belgium) (d) e MINIject (iStar Medical, Wavre, Belgium) (e)[57]

- Suprachoroidal Bio-tissue Device (IANTREK, White Plains, NY, USA) in figura 1.11[58]. Per ridurre al minimo la reazione da corpo estraneo è stato sviluppato un alloinnesto sclerale di matrice acellulare omologa. Il tessuto sclerale altamente idrofilo e poroso è facilmente reperibile presso le banche di tessuti oculari. Ha un diametro di circa 500 μm e una lunghezza di 6 mm. La PIO media ad un anno si riduce del 40%.



Figura 1.11: Suprachoroidal Bio-tissue Device (IANTREK, White Plains, NY, USA)[58]

- Dispositivi MIGS subcongiuntivali

Creano un percorso di drenaggio nello spazio sub-tenone per tenere la PIO entro valori normali e non dannosi per le RGC. In figura 1.12 sono rappresentati i principali dispositivi subcongiuntivali.

- XEN gel stent (Allergan PLC, Dublin, Ireland) è uno shunt idrofilo costituito da un tubo flessibile lungo 6 mm e diametro del lume interno di 45, 63 o 140 μm , realizzato in gelatina (derivata dal collagene suino reticolata con gluteraldeide). Ha ricevuto l'approvazione dalla Food and Drug Administration (FDA) nel 2016 .
- PRESERFLO MicroShunt (Santen, Osaka, Japan) è un piccolo tubo flessibile, morbido e sottile di 8,5mm in SIBS (polystyrene-block-iso- butylene-blockstyrene) che mira a creare via di drenaggio dell'UA dall'occhio verso una bozza sotto la congiuntiva. Per le sue caratteristiche è indicato per GAA nei casi in cui la pressione non è sufficientemente ridotta con altri metodi, se il paziente è intollerante ai colliri, o se il campo visivo continua a peggiorare nonostante gli approcci tradizionali.
- VisiPlate (Avisi Technologies, Filadelfia, PA, USA) è un dispositivo flessibile e ultrasottile costituito da una piastra di ossido di alluminio da 400 nm rivestita con uno strato di parilene-C spesso 2 μm . Una serie di esagoni intramezzati da canali sono stati realizzati sulla superficie per fornire un deflusso lento e controllato dell'UA
- GORE GDI (WL Gore & Associates, Newark, DE, USA) è un dispositivo di 100 μm di spessore costituito da una tasca a doppio strato di politetrafluoroetilene espanso (ePTFE) collegata a un tubo di silicone pensato da essere inserito nella camera anteriore. L'UA viene deviato nel serbatoio tramite il tubo ed in seguito percola dalla tasca doppia in GORE ai tessuti circostanti. L'ePTFE promuove l'integrazione fisiologica del tessuto dopo l'impianto, infatti questi impianti mostrano la formazione di capsula fibrotica più

sottile e meno densa rispetto a quelle che si formano sui dispositivi commerciali utilizzati.

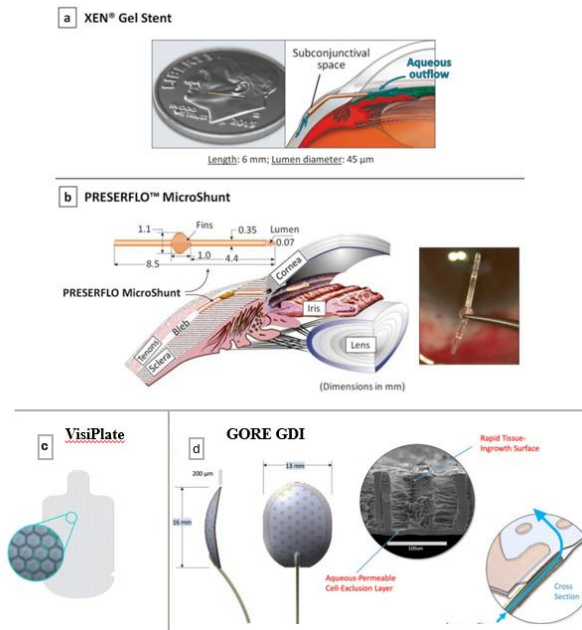


Figura 1.12: MIGS subcongiuntivali: XEN gel stent (Allergan PLC, Dublin, Ireland) (a) , PRESERFLO MicroShunt (Santen, Osaka, Japan)(b), VisiPlate (Avisi Technologies, Filadelfia, PA, USA)(c) GORE GDI (WL Gore & Associates, Newark, DE, USA)(d)[57]

- Il dispositivo EX-PRESS (Alcon Laboratories, Inc., Texas, USA) in figura 1.13 è un impianto in acciaio inossidabile di grado medico (316LVM) di forma tubolare, lungo 2,64 mm, con lume interno di 50 o 200 µm, proposto come un'alternativa semplice e sicura alla trabeculectomia. L'estremità distale del tubo di drenaggio è inclinata per facilitare l'inserimento mentre i tre orifizi presenti all'estremità distale offrono un passaggio alternativo per l'UA quando il tubo di drenaggio principale è bloccato dall'iride.



Figura 1.13: Dispositivo EX-PRESS (Alcon Laboratories, Inc., Texas, USA)[59]

2. Nuovi biomateriali e dispositivi nel trattamento del glaucoma

Lo stato di privilegio immunitario dell'occhio e la presenza della barriera emato-retinica che limita la penetrazione sistemica della maggior parte dei biomateriali potrebbe indurre a pensare all'occhio come un tessuto meno ostico nell'interagire con substrati a scopi terapeutici. I biomateriali che normalmente sono biocompatibili, non tossici si prestano ad essere processati con tecniche che ne migliorano le caratteristiche morfologiche. Una delle tecniche più utilizzate nella realizzazione di dispositivi per il trattamento del glaucoma è l'elettrofilatura con cui è possibile creare strutture che imitano il sistema di drenaggio dell'occhio o fungono da supporto per la somministrazione dei farmaci ipotensivi nell'area bersaglio [60].

2.1 L'elettrospinning

L'elettrospinning è una tecnica brevettata nel 1902 che ha visto la sua diffusione grazie alla versatilità, economicità ed alla possibilità di ottenere micro e nanofibre. Il getto di una soluzione polimerica sottoposto ad un campo elettrico, durante la fase di volo, che intercorre tra l'ugello da cui esce e il collettore a carica opposta su cui si depositerà, si va a frammentare fino a formare le fibre di interesse.

Gli elementi che servono per l'elettrospinning sono:

- Pompa: genera il flusso di soluzione polimerica;
- Siringa: è collegata alla pompa, contiene la soluzione polimerica ed ha l'ago/ugello caricato con uno dei due poli del generatore;
- Generatore di alta tensione: genera la differenza di potenziale tra l'ugello e il collettore;
- Collettore metallico: raccoglie le fibre ed è collegato a terra;

La differenza di potenziale tra l'ugello della siringa ed il collettore fa sì che una goccia di polimero, sottoposta alla forza di Coulomb e alle forze repulsive prodotte dalle sue cariche superficiali, sia distorta fino a formare il cono di Taylor (figura 2.0). Quando la tensione superficiale risulta inferiore rispetto alle forze elettrostatiche si ha un getto liquido ed un processo di instabilità ("momento di frusta" o "whipping motion") dà il via al vero e proprio processo di elettrospinning. Nella fase di volo si ha l'evaporazione del solvente che porta, oltre ad un ulteriore aumento della carica superficiale del getto, alla formazione di sole fibre polimeriche sul collettore.

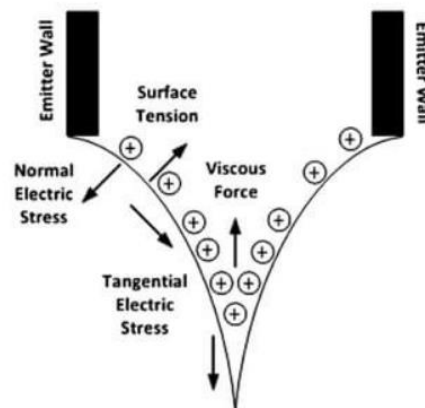


Figura 2.0: Schema delle forze presenti nel cono di Taylor[61]

Per ottenere fibre con una morfologia ben determinata e conformi alle aspettative di progetto bisogna lavorare su vari parametri da ottimizzare.

- Parametri del sistema:
 - Struttura del polimero: bisogna scegliere il polimero più adatto agli scopi da perseguire.
 - Concentrazione: se è minima si formeranno beads mentre se è eccessiva non si otterrà un flusso costante. All'interno del range utile (concentrazione ottimale) al crescere della concentrazione cresce il diametro della fibra.

- **Peso Molecolare:** al crescere del PM il diametro finale della fibra sarà maggiore. A parità di concentrazione della soluzione se il PM cresce si riduce la velocità di evaporazione del solvente poiché aumenta la viscosità ed il rischio di formazione di nastri.
 - **Viscosità:** il range utile dipende dal materiale ed ha un minimo sotto il quale non si ottengono più fibre continue ed un massimo oltre il quale non è più possibile estrarre il materiale.
 - **Conducibilità:** all'aumentare della conducibilità si ha un aumento del diametro della fibra elettrospinnata.
 - **Tensione superficiale della soluzione:** riducendola è possibile ottenere fibre con campi elettrici inferiori.
 - **Parametri di processo:**
 - **Potenziale elettrico:** esiste un valore della tensione oltre il quale si induce la polarizzazione della soluzione necessaria alla formazione del getto del fluido. In molti sostengono che all'aumentare del voltaggio aumenti anche il diametro delle fibre ma vi sono altri studi che hanno ottenuto l'effetto opposto. Questa discordanza potrebbe invece essere legata non all'aumento del potenziale ma alle diverse impostazioni della distanza tra ugello e collettore.
 - **Distanza tra capillare e collettore:** è necessario impostare una distanza che permetta la corretta evaporazione del solvente prima che la fibra raggiunga il collettore.
 - **Flusso della soluzione polimerica:** per bassi flow rate il solvente ha più tempo per evaporare
 - **Forma e movimentazione dello schermo di raccolta:** esistono diversi tipi di collettori. Quelli piani permettono di ottenere fibre in conformazione random ma sono state sviluppate diverse tecniche e collettori di forme diverse per produrre fibre allineate come ad esempio: il mandrino rotante (Rotating drum), elettrodi paralleli separati da uno spazio vuoto, applicazione in sequenza di alti voltaggi ed elettrodi con geometria custom.
 - **Parametri ambientali:**
 - **Temperatura:** se aumenta la temperatura diminuisce la viscosità e il diametro della fibra.
 - **Umidità:** influenza la volatilità del solvente, la carica e la tensione superficiale promuovendo il getto continuo.
 - **Difetti di filatura**
- Se i parametri non sono adeguatamente ottimizzati si ottengono dei difetti di filatura.
- **Beads (perline):** rigonfiamenti della fibra sono indice di un'evaporazione del solvente lenta, che è avvenuta solo dopo la deposizione sul collettore.
 - **Nastri:** fibre ancora ricche di solvente quando si depositano sul collettore che collassano su sé stesse perdendo la geometria cilindrica del diametro [62].

2.2 Dispositivi elettrofilati per il glaucoma

I dispositivi di drenaggio per il glaucoma (DDG) convenzionali hanno una vita funzionale modesta a causa dell'incapsulamento fibrotico del dispositivo che spesso porta al fallimento o

dell'obiettivo pressorio o del dispositivo stesso. L'UA che drena nello spazio sottocongiuntivale contiene fattori solubili implicati nel reclutamento e nell'attivazione dei fibroblasti, come il fattore di crescita TGF- β , il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF). Inoltre, il continuo deflusso dell'UA, provoca una tensione meccanica della bozza che innesca l'attivazione dei fibroblasti. Per questo motivo vi è la crescente necessità di progettare DDG che consentano di abbassare il tono in modo sicuro ed efficace, controllare il deflusso acquoso controllato per evitare l'ipotonia e ridurre l'esposizione subcongiuntivale alle citochine acquose ma soprattutto evitare la fibrosi.

- Josyula et al [63] hanno progettato DDG parzialmente degradabili, basati su nanofibre PET/PGA. Il primo più corto con una parete più spessa e più rigida (PCS1: lunghezza 6 mm, OD: 450 μ m) ed il secondo più lungo e più flessibile (PCS2: lunghezza 9 mm, OD:350 μ m). I biomateriali sono stati processati con la tecnica dell'elettrospinning al fine di ottenere fibre con proprietà simili a quelle delle ECM native sane (composte da fibrille che variano tra i 10 nm e 1 μ m di larghezza con dimensioni dei pori comprese tra 1 e 2 μ m). In questo studio sono state realizzate nanofibre elettrofilate con diametro compreso tra i 400-1000 nm che hanno indirizzato i fibroblasti verso un fenotipo non fibrotico. DDG in PU (Chronoflex® C80, PU) con superficie esterna in nanofibre mostrano un tasso di fibrosi sottocongiuntivale inferiore e migrazione del dispositivo nell'occhio limitata rispetto ai corrispettivi dispositivi lisci costruiti con lo stesso polimero. È possibile che nella fase post-operatoria acuta, la rugosità superficiale delle nanofibre possa fornire un effetto di ancoraggio. I DDG basati su nanofibre mantengono la loro morfologia e architettura per almeno 1 anno in vivo.
- Parikh et al. [64] hanno sviluppato un nuovo shunt nanostrutturato tramite tecnica dell'elettrospinning che promette di ottenere una riduzione ottimale della PIO in tutte le fasi del periodo postoperatorio. Sono stati studiati due GDD di 6 mm di lunghezza ciascuno: il primo, denominato shunt PET (PS) è uno shunt cilindrico a piccolo lume (diametro interno di 50 μ m) in polietilene tereftalato (PET) non degradabile, il secondo è il Pressure Control Shunt (PCS) composto da un nucleo esterno in PET (diametro:75 μ m) e un nucleo interno degradabile composto da nanofibre di poliglicolide (PGA) che si riassorbono in tre settimane. PS ha dimostrato lume pervio e mantenuto le sue dimensioni per tutta la durata dello studio. Nel PCS la resistenza al flusso è diminuita linearmente durante lo studio fino ad avere il valore minimo al 28°giorno, quando il nucleo interno era completamente degradato.
- Gli inserti in nanofibra possono anche coadiuvare e migliorare i dispositivi MIGS già in commercio come, ad esempio, fatto da Olson et al. [65] che hanno sviluppato un GDD che consente un controllo post-operatorio non invasivo e personalizzato del drenaggio dell'UA adattando un tubo in silicone (calibro 23) con una membrana nanoporosa di polivinilidenefluoruro (PVDF). La membrana nanoporosa può essere perforata con un raggio laser Nd:YAG per regolare il flusso di umore acqueo a seconda del valore di PIO target che serve mantenere.

Gli inserti in nanofibra riscontrano notevole interesse per l'ampio rapporto superficie-volume che li rende, insieme alla facilità di avere un buon contatto con la superficie oculare, dei papabili mezzi di somministrazione di farmaco a lungo termine.

- Gimaudo et al., hanno progettato un nuovo inserto oculare costituito da nanofibre di acido ialuronico (HA) in combinazione con acido ferulico (FA), un antiossidante e un peptide antimicrobico (ϵ -polilisina, ϵ -PL). L'inserto ha consentito il rilascio completo di ϵ -PL, sia da inserti vuoti che incapsulati con farmaco, entro mezz'ora sotto mezzo di dissoluzione. Gli inserti caricati con FA hanno mostrato una notevole efficacia antimicrobica contro *P. aeruginosa* e *S. aureus* [35].
- Khalil et al. [66] hanno sviluppato per la prima volta un'alternativa al collirio convenzionale. Hanno progettato una matrice Nanoparticelle-in-nanofibre (NPs-in-NFs) polimerica-multistrato biodegradabile mucoadesiva monodose di azitromicina. L'inserto oculare è stato preparato con tecnica di elettrofilatura utilizzando polivinilpirrolidone e ne è stata studiata l'efficacia in vitro contro l'infezione batterica nell'occhio. Il profilo di rilascio e permeazione del farmaco ha stabilito che l'inserto oculare potrebbe rendere il rilascio controllato del farmaco fino a dieci giorni. Nel caso del glaucoma un inserto oculare caricato con farmaci antifibrotici (per la gestione post-chirurgica) o con ipotensivi potrebbe essere ideale per avere maggiore compliance [35].

2.3 PVDF

Un nuovo materiale in grado di limitare l'incapsulamento fibrotico, facilmente processabile attraverso elettrospinning, il polivinildenfluoruro (PVDF), è stato proposto da Klapstova et al. nel 2021 per il trattamento del glaucoma [68]. Il gruppo aveva già proposto un GDD elettrofilato, combinazione di PVDF/PEO (parte esterna) e parte interna in PVA reticolato. Le fibre di PVDF/PEO raccolte su un'asta metallica rotante del diametro di 1,5 mm erano servite a creare l'impianto tubolare da riempire manualmente con filati di PVA ricavati da nanofibre parallele elettrospinnate su un collettore rotante 60 giri/min e successivamente ritorte avevano mostrato capacità di filtrazione, biocompatibilità e buona resistenza alla crescita cellulare [67]. Con gli studi effettuati successivamente, confrontando diverse formulazioni di materiali nanofibrosi a base di PVDF puro a diversi pesi molecolari o con PEO, processati mediante elettrofilatura, sono stati testati gli effetti sulla proliferazione cellulare. Il PVDF si è dimostrato adatto alla realizzazione di DGG innovativi, soprattutto se in combinazione con il PEO poiché induce la soppressione della proliferazione cellulare piuttosto che l'eliminazione dei fibroblasti. Il PVDF, appartenente alla famiglia dei fluoropolimeri, è noto per le eccellenti proprietà piezoelettriche, la stabilità termica e la resistenza meccanica e chimica. La sua unità ripetitiva semplice $(\text{CH}_2\text{-CF}_2)_n$, mostrata in figura 2.1, lo rende sia resistente che tenace. Il PVDF ha punto di fusione di circa 177 °C e una densità di 1,77 g/cm³ a temperatura ambiente.

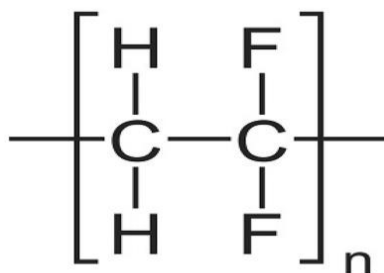


Figura 2.1: Unità ripetitiva del PVDF

Mostra una struttura semicristallina e una temperatura di transizione vetrosa (T_g) di circa -35°C . Si dissolve solo in alcuni solventi polari come la dimetilformammide (DMF), il dimetilsolfossido (DMSO), l'*N*-metil pirrolidone (NMP) o la dimetilacetammide (DMAc) poiché è un polimero organico. La fase cristallina gli conferisce un'eccezionale stabilità termica mentre la flessibilità si deve alla regione amorfa del polimero [69]. Il PVDF possiede 5 forme cristalline: α (TGTG', forma II), β (TTTT, forma I), γ (T₃GT₃G', forma III), δ e ϵ che si formano sotto l'influenza dei processi produttivi. I parametri di lavorazione, i trattamenti meccanici, termici, elettrici e chimici, influenzano le proprietà del PVDF [70]. Di queste forme cristalline tre sono con dipoli permanenti, ovvero le fasi β , γ e δ . La fase α è non polare, è una fase cristallina molto comune che può essere ottenuta direttamente dalla cristallizzazione dopo fusione del materiale. Le strutture γ e δ hanno celle unitarie polari, ma momenti di dipolo più piccoli di quelli della fase β . Le fasi α e δ si distinguono per l'orientamento del momento di dipolo delle due molecole presenti nella cella unitaria: fase δ sono paralleli e nella fase α sono antiparalleli, si può quindi indurre il cambiamento tra questi 2 polimorfismi applicando un campo elettrico esterno dell'ordine di 100 MV/m.

Con campi dell'ordine di 500 MV/m, la fase δ può essere trasformata in fase β . Questo materiale si è dimostrato molto promettente sia per la somministrazione di farmaci per il glaucoma con curva di rilascio controllata sia un ottimo punto di partenza per sviluppare sensori e trasduttori. Caratterizzato da atomi di fluoro e idrogeno uniformemente distribuiti lungo la catena polimerica va facilmente incontro a rimozione dell'atomo di fluoro sia nella catena polimerica stessa che tra catene polimeriche adiacenti, con conseguente formazione di strutture reticolate. Gode di prestazioni costanti e per questo motivo usato in prodotti con requisiti particolarmente elevati riguardanti le radiazioni ultraviolette, i danni microbiologici, l'abrasione, la resistenza ai graffi. È importante sottolineare che tutte queste caratteristiche sono combinate con un costo accessibile e facile reperibilità del polimero [71].

2.4 I siliconi di grado medico

I siliconi di grado medico sono il materiale prediletto per la fabbricazione degli impianti commerciali per il drenaggio di UA nel glaucoma. Sono utilizzati nella pratica clinica, nonostante i limiti imposti alla biocompatibilità dal comportamento idrofobico che può facilmente portare a reazioni da corpo estraneo o a incapsulamento fibrotico dell'impianto, perché caratterizzati da flessibilità, elevata stabilità termica e trasparenza. I siliconi morbidi inoltre hanno la capacità di ridurre i danni a carico dei tessuti circostanti lo stent rendendo il processo di impianto molto più semplice. Altra capacità molto sfruttata è la radiopacità che consente di visualizzare facilmente i dispositivi in silicone ai raggi X, e quindi di effettuare un follow-up[72]. Numerosi DDG sperimentali cercano di migliorarne le caratteristiche superficiali affinché l'integrazione con il tessuto sia il più fisiologica possibile.

- Gapeeva *et al.* mediante l'aggiunta di elevate quantità di particelle di t-ZnO (45-75% in peso di t-ZnO) nel PDMS liquido sono riusciti a estrarre stent con un diametro di 200-400 μm che mantengono la loro forma cilindrica nello stato non polimerizzato dopo l'estrusione grazie all'elevata viscosità della miscela polimero/ particelle. Il lume dello stent viene ricavato posizionando un filo metallico all'interno dell'ugello durante l'estrusione e rimosso meccanicamente solo al termine del processo di indurimento. L'aggiunta di particelle t-ZnO ha comportato un aumento della rugosità, vitalità

cellulare significativamente ridotta al 57 ± 8 e al $43 \pm 3\%$ su stent contenenti rispettivamente il 60 e il 75% in peso di t-ZnO. Una quantità maggiore di particelle di t-ZnO sulla superficie dello stent porta, probabilmente, ad un aumento dei contatti locali con le cellule e alla rottura della membrana cellulare. Come meccanismo secondario, gli ioni Zn rilasciati potrebbero anche contribuire alle proprietà di inibizione cellulare nelle immediate vicinanze della superficie dello stent [73].

- La piattaforma SpyGlass (figura 2.2) è costituita da una IOL acrilica idrofobica monopezzo e da due cuscinetti a rilascio di farmaco (fissati saldamente a ciascuna aletta). I doppi pad sono progettati per eluire ininterrottamente per più anni bimatoprost un trattamento del glaucoma in pazienti sottoposti a chirurgia della cataratta. La IOL impiantata direttamente nel sacco capsulare caricata in un iniettore standard attraverso un'incisione inferiore a 2,4 mm prevede che il farmaco sia continuamente trasportato dall'UA. Anche se questa strategia sembra essere una buona candidata alla somministrazione di farmaco per un lungo lasso di tempo non è stata ancora approvata dalla FDA.

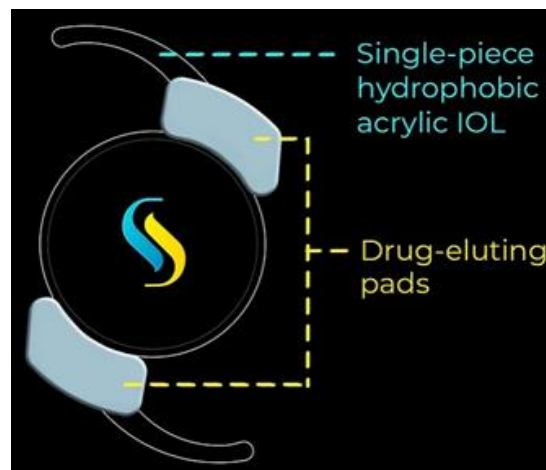


Figura 2.2: piattaforma SpyGlass [74]

- Windhövel et al[75] hanno confrontato sei diversi siliconi di grado medico in vitro per trovare quello più adatto ad essere impiegato nei DDG. Nonostante siano stati sviluppati nuovi design e materiali la biocompatibilità dei siliconi rimane ancora un problema da approfondire e risolvere. Le cellule, infatti, non possono interagire direttamente con i materiali sintetici, ma si legano alla superficie tramite proteine. Il legame proteine - superficie determina la biocompatibilità del materiale. La fibronectina, responsabile dell'adesione dei fibroblasti induce clusterizzazione cellulare sulla superficie idrofobica dei siliconi a causa del più forte legame cellula-cellula rispetto a quello che si instaura tra cellula-substrato. Le proprietà fisiche rugosità, forma, flessibilità e chimiche come la bagnabilità di un materiale influenzano il legame proteine-substrato e di conseguenza l'integrazione dell'impianto nei tessuti. Choritz et al.[76] analizzando la rugosità superficiale dei vari dispositivi commerciali hanno notato che superfici lisce possono portare ad un esito migliore del processo di integrazione del silicone poiché meno soggette all'incapsulamento fibrotico.

2.4.1 II SILPURAN

SILPURAN® 2420 A/B (WACKER srl) è un silicone commerciale di cui sono state studiate le proprietà antiadesive per possibili impieghi nei DDG [77]. I polisilossani sono macromolecole costituite da silicio-ossigeno a cui si legano, in corrispondenza del Si, porzioni organiche. I gruppi organici legati al Si possono essere metilici, vinilici, fenilici. Per convertire la gomma non polimerizzata in un prodotto meccanicamente stabile è necessario un reticolante. I filler, necessari per rinforzare la rete elastomerica, hanno un'influenza cruciale sulle proprietà della gomma elastomerica. Rispetto ad altri elastomeri, la gomma siliconica può comprendere solo polimero, reticolante e riempitivo. La scelta degli additivi (catalizzatori, stabilizzatori termici, promotori di adesione, modificatori reologici e coloranti) infatti non è necessaria come in altri tipi di elastomeri [78]. Il SILPURAN® 2420 A/B è una gomma siliconica vulcanizzante a temperatura ambiente in 2 parti (RTV-2). Le due parti vulcanizzano dopo la miscelazione e formano un materiale altamente elastico, resistente al calore e flessibile sia alle alte che alle basse temperature. I gruppi Si-O della catena polimerica hanno un'energia di legame elevata di 451 kJ/mol. I gruppi laterali organici schermando la catena fanno in modo che il silicone abbia bassa energia superficiale, elevata resistenza agli agenti chimici, ai raggi UV e alle radiazioni e superficie idrofobica. La reticolazione (in figura 2.3) della gomma avviene per mezzo dell'idrosililazione dei gruppi vinilici; quindi, non si formano sottoprodotti volatili e non vi è rischio di reversione della reazione di reticolazione a temperatura elevata. Il periodo di tempo massimo durante il quale la miscela catalizzata di A e B è processabile (potlife medio) dei siliconi RTV-2 varia tra 30 minuti e 6 ore. Tutte queste caratteristiche, insieme alla facilità di produzione (miscelazione e colata) rendono il SILPURAN un buon candidato per possibili impieghi nella gestione del glaucoma, magari modificando la rugosità superficiale con trattamenti al plasma per migliorarne la già ottima biocompatibilità mostrata negli impieghi dell'ingegneria tissutale.

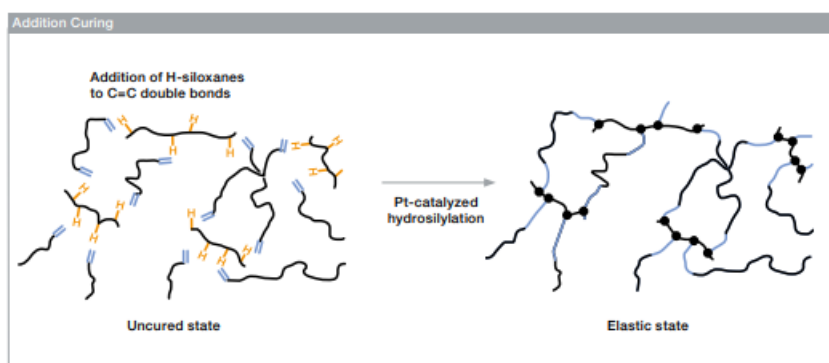


Figura 2.3: vulcanizzazione del SILPURAN® 2420 A/B

2.5 Limiti delle modifiche superficiali tradizionali

Gli antimetaboliti (mitomicina-C o 5-fluorouracile) somministrati in concomitanza dell'impianto e nel decorso post operatorio rimangono il gold standard per mitigare la fibrosi post-chirurgica, ma sono associati a tassi elevati di complicanze e di fallimento chirurgico, quindi è necessario sfruttare altri meccanismi, quali ad esempio la modifica superficiale dell'impianto, per mantenere intatte le proprietà meccaniche del dispositivo e contemporaneamente prevenire il progressivo rimodellamento dei tessuti e la formazione di una

cicatrice fibrotica[79]. Bisogna ricordare infatti che l'impianto di un dispositivo per la gestione del glaucoma è consigliato solo in ultima istanza, quando tutti gli altri approcci hanno fallito l'obiettivo pressorio, sono quindi da evitare gli interventi di revisione e progettando impianti sicuri ed efficaci nel lungo periodo (regola "10-10-10":tempo chirurgico di 10 minuti, raggiungimento di PIO postoperatoria di 10 mmHg e durata di almeno 10 anni [80]). Negli ultimi anni nuovi materiali funzionali per l'uso in campo biomedico hanno subito un forte interesse a causa di un cambio di paradigma dei criteri di progettazione dell'interfaccia materiale-dispositivo che ha visto abbandonare lo sviluppo di materiali bioinerti e passivi e, conseguentemente preferire quelli biofunzionali, biomimetici e bioistruttivi. I materiali biofunzionali, in cui almeno un componente che mira a controllare le reazioni materiale-proteina all'interfaccia materiale-tessuto, possono essere ottenuti tramite trattamenti superficiali chimici e/o fisici, rivestimenti polimerici e ceramici, che modificano la topografia, la rigidità e la chimica della superficie. I materiali biofunzionali possono anche essere bioattivi se includono prodotti farmaceutici o biomolecole. I costrutti biomimetici tentano invece di ricapitolare i diversi segnali fisici e biochimici tipici della nicchia fisiologica nativa al fine di migliorare la biointegrazione e preservare nel tempo le funzioni e l'efficacia del dispositivo [81]. La maggior parte delle proteine ha conformazioni native corrispondenti a configurazioni minime di energia libera di Gibbs nell'ambiente acquoso. L'introduzione della superficie di un materiale esogeno può cambiare drasticamente l'energia del sistema, introducendo così cambiamenti nella struttura della proteina, che nel cercare di adattarsi spesso va in contro a denaturazione, perdita di funzione e può indurre reazioni immunitarie avverse. Il sistema immunitario rileva le strutture non native e cerca di isolarle attraverso incapsulamento fibrotico e conseguente creazione di tessuto cicatriziale non funzionale. Una delle prime strategie che ha tentato di mitigare questo problema è quella di limitare l'adsorbimento proteico sulle superfici per mezzo di rivestimenti antivegetativi o antibiofouling. Quando si vuole biointegrazione deve essere mitigato il biofouling non specifico, ad esempio, attraverso la preadesione di proteine che possono promuovere comportamenti cellulari di interesse specifico in superficie. L'adsorbimento non covalente, fisico o covalente di biomolecole risultano essere le tecniche convenzionali più usate per perseguire questo scopo.

- L'adsorbimento fisico si verifica, tipicamente a causa di interazioni intermolecolari deboli, forze elettrostatiche, di van der Waals e interazioni idrofobiche quando superfici incontaminate o pre-funzionalizzate vengono incubate in soluzioni contenenti biomolecole. I residui idrofili delle proteine poste in un ambiente contenente molecole d'acqua vengono esposti in modo da ridurre al minimo l'energia libera di Gibbs del sistema, di conseguenza, durante l'interazione con substrati idrofobici, vanno incontro a denaturazione, perdita della conformazione 3D e della funzionalità. Un comportamento idrofilo del materiale è desiderabile in molte applicazioni biomediche e può essere ottenuto introducendo gruppi polari attraverso tecniche di funzionalizzazione superficiali quali la polimerizzazione, il trattamento al plasma e/o modificando la rugosità superficiale.
- L'immobilizzazione covalente impedisce la sostituzione continua delle proteine immobilizzate con altre biomolecole (effetto Vroman) riducendo il tasso di desorbimento delle biomolecole. Per immobilizzare permanentemente le biomolecole sulle superfici possono essere usate tecniche dirette o di bioconiugazione. I substrati sono funzionalizzati con gruppi chimici che facilitano l'immobilizzazione delle biomolecole utilizzano metodi chimici specifici per ogni tipo di substrato. Gli approcci

diretti introducono gruppi funzionali (carbossilici, aldeidici, amminici o ossidrilici) in grado di formare legami covalenti con i gruppi amminici o carbossilici delle catene laterali delle biomolecole. I rivestimenti bioadesivi su substrati che imitano l'adesione delle cozze sono ampiamente utilizzati poiché versatili. L'adesione delle cozze è consentita dalla secrezione di proteine contenenti catecolo che coinvolgono L-3,4-diidrossifenilalanina (L-DOPA). I gruppi funzionali catecolici di DOPA possono funzionalizzare metalli e polimeri mediante meccanismi che vanno dall'interazione fisica ai legami covalenti.

Anche le biomolecole, come le proteine, possono essere immobilizzate su varie superfici funzionalizzate attraverso:

- Reazioni di carbodiimmide: formano un legame ammidico tra i gruppi amminico e carbossilico presenti sulla superficie da funzionalizzare e le catene laterali delle biomolecole da immobilizzare.
- Formazione di basi di Schiff: I gruppi carbonilici, come aldeidi e chetoni, possono formare intermedi di Schiff con gruppi amminici primari e secondari presenti sulle superfici e con gruppi amminici delle proteine. Aggiungendo cianoboridruo di sodio alla soluzione, il legame C=N si riduce e si ottiene un legame C-N altamente stabile.
- Reazione tiolica: I legami chimici disolfuro (S-S), si formano nelle reazioni di scambio disolfuro di gruppi funzionali contenenti tioli. Solo gli amminoacidi della cisteina possono reagire con i gruppi funzionali del tiolo sulla superficie.

I metodi chimici per la biofunzionalizzazione delle superfici sono difficili da implementare su larga scala, dispendiosi in termini di tempo, spesso impiegano sostanze chimiche pericolose da evitare per migliorare le caratteristiche di biomateriali da impiantare o addirittura non approvate. Per questo motivo negli ultimi decenni sono state sviluppate molte altre tecniche di biofunzionalizzazione come, ad esempio, i trattamenti al plasma [81].

2.6 Trattamenti di modifica superficiale con plasma

Un plasma, pur potendo mostrare un comportamento caratteristico dei tre stati della materia (gas, liquido e solido) per effetto di densità e temperatura, è spesso descritto come il quarto stato della materia [82]. Definire un plasma come “un gas quasi neutro di particelle cariche che mostra un comportamento collettivo” [83], [84] pone invece l'accento sugli attributi fisici dello stesso. Elettroni e ioni liberi che compongono il plasma hanno densità di carica complessive che si annullano vicendevolmente. Indicando con n_e la densità di numero di elettroni e con n_i quella degli ioni con stato di carica Z , allora localmente si ha che $n_e \approx Zn_i$. Il comportamento “collettivo” deriva dalla natura a lungo raggio del potenziale di Coulomb. Disturbi locali possono avere una forte influenza su regioni remote del plasma. I campi macroscopici dominano sulle fluttuazioni microscopiche di breve durata, uno squilibrio di carica netta $\rho = e(Zn_i - n_e)$ darà origine a un campo elettrostatico secondo la legge di Gauss $\nabla \cdot E = \rho/\epsilon_0$. Le stesse cariche, che si muovono con velocità v_e e v_i , daranno origine a una densità di corrente $J = e(Zn_i v_i - n_e v_e)$. Questa densità di corrente, seguendo la legge di Ampère, a sua volta induce un campo magnetico $\nabla \times B = \mu_0 J$. Questi campi elettrici e magnetici determinano gran parte della dinamica del plasma. La quasi-neutralità è uno stato che il plasma cerca attivamente di raggiungere riaggiustando la distribuzione di carica locale in risposta a un disturbo.

Considerando una sfera carica positivamente immersa in un plasma, si osserva che gli ioni nelle immediate vicinanze della sfera saranno respinti mentre gli elettroni saranno attratti, provocando così un'alterazione della densità di carica media in quella regione.

A parità di temperatura si avrà che, in un plasma idrogeno con $Z=1$, gli ioni sono quasi stazionari sulla scala temporale degli elettroni e la densità elettronica seguirà una distribuzione di Boltzmann: $n_e = n_i \exp(e\phi/k_B T_e)$; dove n_i è la densità di ioni, k_B è la costante di Boltzmann e $\phi(r)$ è il potenziale creato dalla perturbazione esterna.

Dalla legge di Gauss si può scrivere che: $\nabla^2\phi = -\rho/\epsilon_0 = -e/\epsilon_0 (n_i - n_e)$.

Considerando una geometria sferica $\phi_D = 1/4\pi\epsilon_0 \exp(-r/\lambda_D)/r$, per cui ϕ_D tende a 0 per $r=\infty$, si ricava la caratteristica della scala di lunghezza λ_D all'interno del fattore esponenziale, nota come lunghezza di Debye: $\lambda_D = ((\epsilon_0 k_B T_e)/(e^2 n_e))^{1/2}$.

Un plasma ideale ha molte particelle per sfera di Debye che esibiscono comportamento collettivo e quindi dominanza degli effetti collettivi sulle collisioni tra particelle [82].

La ionizzazione del gas, e quindi, la generazione di plasma, si ottiene più fornendo energia al gas attraverso campi elettromagnetici utilizzando corrente alternata, corrente continua o continua pulsata. Un'ulteriore classificazione dei plasmi può essere fatta in base al grado di ionizzazione. Il plasma può essere completamente ionizzato, se dividendo la densità degli ioni per la densità totale di tutte le molecole e ioni del gas neutro si ottiene un valore pari a 1, o parzialmente ionizzato se si ottiene un valore inferiore a 1. I plasmi sono anche classificati come termici/di equilibrio, quasi termici e non termici/non di equilibrio [81]. I plasmi non termici possono essere ottenuti sia a bassa che ad alta pressione. È infatti questo parametro a definire il percorso libero medio delle molecole nel plasma. Il percorso libero medio è la distanza media che una particella percorre prima di scontrarsi con altre particelle. Il plasma a bassa pressione viene generato in una camera in cui è praticato il vuoto, questo porta le particelle ad avere un percorso libero medio maggiore rispetto alla pressione atmosferica. Il campo elettrico applicato al gas a bassa pressione accelera gli elettroni liberi che guadagnano energia sufficiente a creare una coppia ione-elettrone nella collisione con una molecola di gas. Una volta che gli elettroni raggiungono la soglia energetica di ionizzazione, questa procede per collisioni successive con le molecole di gas e conseguente rilascio di elettroni. La potenza necessaria per generare plasma a bassa pressione è inferiore a quella necessaria a pressione atmosferica, inoltre, con il vuoto in camera si ottiene la riduzione delle reazioni indesiderate delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto con le specie plasmatiche. Nell'ingegneria delle superfici i processi al plasma possono essere suddivisi in processi di deposizione e di trattamento superficiale senza deposizione. Nel primo caso la deposizione da vapore potenziata dal plasma può essere chimica (PECVD nota anche come polimerizzazione al plasma quando vengono utilizzati gas monomeri organici) o fisica (PEPVD mediante sputtering del magnetron e/o deposizione ad arco). Nel secondo caso le superfici vengono modificate fisicamente o chimicamente senza l'aggiunta di rivestimenti. Il trattamento al plasma a bassa pressione è una tecnica di funzionalizzazione superficiale non depositante che è stata sviluppata per creare gruppi funzionali chimici su superfici polimeriche. L'immobilizzazione covalente di biomolecole su tali superfici può essere ottenuta direttamente o indirettamente utilizzando linker chimici (EDC/NHS e glutaraldeide). I gruppi funzionali possono essere creati sulle superfici trattate al plasma a bassa pressione con due approcci: durante il trattamento al plasma a seguito delle interazioni plasma-superficie o dopo il processo

al plasma tramite una fase di innesto. Vari gas reattivi, come l'ossigeno e l'azoto, e gas non reattivi, come l'argon e l'elio, sono comunemente usati per il trattamento delle superfici. L'azoto e l'ammoniaca sono usati per formare gruppi amminici primari sulle superfici polimeriche. L'ossigeno gassoso è invece usato per introdurre gruppi ossidrilici (-OH), carbossilici (-COOH) e carbonilici (-CO-). I gas non reattivi come l'argon sono tipicamente impiegati per la pulizia dei substrati e non partecipano alle reazioni ma possono rompere alcuni legami chimici degli strati atomici più superficiali e formare quindi radicali altamente reattivi che provocano l'autossidazione superficiale in seguito all'esposizione all'atmosfera [81]. La modifica della superficie al plasma è tecnica di lavorazione dei materiali economica, efficace, affidabile, riproducibile che induce modifiche alle caratteristiche superficiali, chimiche, tribologiche, elettriche, ottiche, biologiche e meccaniche di una vasta gamma di materiali [85]. I trattamenti al plasma a bassa pressione possono rappresentare una svolta nel trattamento superficiale dei dispositivi impiantabili per la gestione del glaucoma in quanto vanno a modificare la superficie senza intaccare le proprietà massive, che hanno fino ad adesso determinato la scelta dei biomateriali da utilizzare nei DGG.

3. MATERIALI E METODI

Questo lavoro di tesi ha come obiettivo la modifica superficiale, attraverso trattamenti al plasma a bassa pressione, di membrane elettrofilate di PVDF e substrati di silicone che potrebbero rappresentare future applicazioni nella terapia chirurgica del glaucoma. Nel seguente capitolo verranno riportati i materiali presi in esame con i rispettivi processi di produzione, i trattamenti e le diverse caratterizzazioni effettuate sugli stessi.

3.1 Preparazione della formulazione a base di PVDF

Per preparare la formulazione a base di PVDF adatta all'elettrofilatura è stato seguito un protocollo precedentemente ottimizzato. Il PVDF (Sigma-Aldrich®, Mw: 180.000 g/mol) in granuli è stato pesato per poter essere disciolto in concentrazione pari al 18% in peso su volume (w/v) in una soluzione (50% in volume) di Acetone (Honeywell, Riedel-de Haën™) e DMSO (Uvasol®, Merck KGaA). La soluzione così ottenuta è stata trasferita in provette dotate di tappi con la superficie interna ricoperta in cartone e avvolte con parafilm per evitare che i solventi evaporassero. Al fine di favorire la completa solubilizzazione della formulazione, le provette sono state lasciate per 3 ore su una piastra riscaldante con agitatore magnetico impostato a 400 rpm e ad una temperatura, mantenuta da una termocoppia immersa in un bagnomaria, di 50° C.

3.1.1 Electrospinning delle membrane di PVDF

È stato dimostrato che i dispositivi per il drenaggio dell'UA con superfici nanofibrose imitando la matrice extracellulare sana favoriscono la quiescenza dei fibroblasti se confrontati con le superfici lisce dei dispositivi attualmente in commercio [86]. Sfruttando la topografia superficiale si riesce quindi a mitigare l'incapsulamento fibrotico dei dispositivi e a diminuire la probabilità di fallimento dell'impianto. In questo lavoro per ottenere delle membrane porose di fibre nanometriche allineate ed interconnesse si è scelto di utilizzare l'elettrospinning.

Il dispositivo utilizzato per questo lavoro di tesi (mostrato in figura 3) è il Fluidnatek LE-50 (Bionicia), in dotazione presso il DISAT, che ha le seguenti caratteristiche:

- Generatore di alta tensione regolabile fino a 30 kV,
- Portata della pompa a siringa che va da 0,1 µL/h ad un massimo di 6000 mL/h regolata attraverso una forza lineare che varia tra i 100N e i 200N,
- Possibilità di raccogliere le fibre su collettore piano (200 mm x 200 mm) in acciaio inossidabile orientabile verticalmente o orizzontalmente o su un collettore cilindrico rotante in alluminio anodizzato (diametro di 100 mm, lunghezza 200 mm, velocità impostabile da un minimo di 100 giri/min ad un massimo 2000 giri/min),
- Sistema di controllo di temperatura e umidità rilevate tramite appositi sensori posti all'interno della camera di filatura,
- Interfaccia touch screen per impostazione e regolazione dei parametri di processo.



Figura 3.0: Fluidnatek LE-50 (Bionicia) usato per la produzione delle membrane

La soluzione ottenuta, come descritto al paragrafo 3.1, è stata inserita all'interno di siringhe da 5 mL dotate di un ago da 21 G. Una volta preparata tutta la linea, le suddette siringhe sono state collegate una alla volta alla pompa volumetrica dello spinneret. Le membrane nanofibrose sono state realizzate con parametri già precedentemente ottimizzati. La soluzione a base di PVDF è stata elettrofilata per due ore consecutive con il flusso della pompa volumetrica impostato a 1.4 mL/h al fine di ottenere uno spessore che permettesse la manipolazione dei campioni durante i trattamenti al plasma e le successive caratterizzazioni. Il generatore di alta tensione è stato impostato a 20 kV mentre la distanza ago supporto è stata mantenuta pari a 12 cm. La temperatura e l'umidità della camera di filatura sono state monitorate durante ogni processo. Per ottenere delle matrici con fibre allineate è stato usato un collettore cilindrico rotante a 2000 rpm. Le membrane raccolte sul foglio di alluminio che rivestiva il collettore cilindrico sono state lasciate asciugare a temperatura ambiente fino al giorno successivo. Per consentire di valutare gli effetti dei trattamenti al plasma, tramite confronti successivi, le membrane sono state prima analizzate dal punto di vista morfologico e chimico-fisico, e solo successivamente trattate al plasma. In figura 3.1 sono stati schematizzati i passaggi fondamentali che hanno permesso di ottenere le membrane composte da nanofibre allineate a partire dalla soluzione a base di PVDF. Per testare l'ininfluenza dell'allineamento delle fibre sul risultato del trattamento al plasma sono state spinnate delle matrici di PVDF con fibre non allineate (random) utilizzando il collettore piano in posizione orizzontale con gli stessi parametri usati (riassunti nella tabella 3.0) per ottenere le fibre orientate.

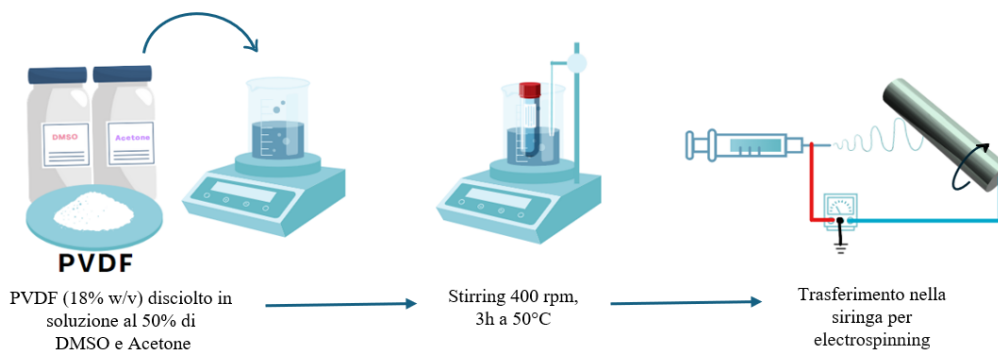


Figura 3.1: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione delle membrane di PVDF

Tabella 3.0: parametri di processo per ESP di membrane in PVDF

PARAMETRI DI PROCESSO	COLLETTORE ROTANTE	COLLETTORE PIANO
Tensione	20 KV	20 KV
Flusso	1.4 mL/h	1.4 mL/h
Rotazione	2000 rpm	-
Distanza ago-collettore	12 cm	12 cm
Durata processo	2 h	2 h

3.2 Preparazione dei campioni in elastomero silconico

I campioni di silicone di grado medicale SILPURAN® 2420 A/B (WACKER srl) sono stati ottenuti facendo reticolare la composizione elastomerica bicomponente in stampi. Il monomero A è stato miscelato con l'agente reticolante B in rapporto 1.1:1 (in volume), secondo le istruzioni del produttore. La soluzione è stata posta in una centrifuga HERMLE z 326 K (Hermle-Labortechnik, Germania) a 3000 rpm per 5 min in modo da rimuovere le bolle che si erano formate durante la miscelazione. Subito dopo la soluzione è stata colata negli stampi posti sul fondo di piastre di Petri in vetro e posta in stufa a 70°C fino a completa reticolazione. Ogni stampo era costituito da un disco di silicone (diametro 9 cm e spessore 0.5 cm) sulla cui superficie erano stati ricavati dei fori passanti di diametro 1 cm ciascuno. In questo modo sono stati ottenuti campioni cilindrici di diametro di base 1 cm ed altezza 0.5 cm. In figura 3.2 sono stati schematizzati i passaggi fondamentali per ottenere i campioni di gomma silconica.

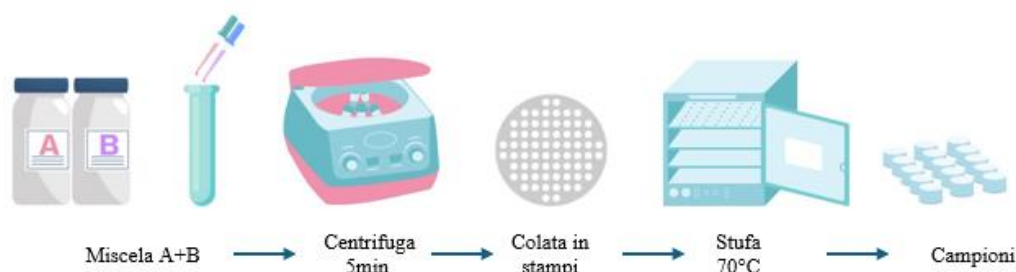


Figura 3.2: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione dei campioni di SILPURAN

3.3 Design of Experiment

Il design of experiment è un metodo statistico che attraverso modelli previsionali ha l'obiettivo di massimizzare le informazioni derivanti dall'esecuzione degli esperimenti variando simultaneamente più fattori d'ingresso alla volta. È utilizzato per minimizzare il numero di esperimenti da eseguire per giungere alla definizione delle relazioni esistenti tra le variabili in ingresso e quelle in uscita esplorando l'intero dominio sperimentale, definito dai range delle variabili di ingresso. Permette sia di selezionare i singoli fattori significativi sia di valutare le interazioni degli stessi nel produrre una risposta. Si contrappone all'approccio classico univariato dove grazie alla sovrapposizione degli effetti si valuta la singola variabile di ingresso mantenendo fisse le altre. Rispetto agli approcci classici il DoE è meno dispendioso sia in termini di costi che di tempo e conduce a conclusioni non erranee anche se le interazioni tra le

variabili risultano essere non additive. Per poter usare il DoE bisogna innanzitutto selezionare gli obiettivi degli esperimenti, le variabili indipendenti e i valori operativi entro cui farle variare (dalla letteratura, dai range di funzionamento degli strumenti usati, dalle risorse a disposizione). Prima di procedere con gli esperimenti bisogna scegliere il modello matematico adatto e stilare una matrice sperimentale, dove sono indicati gli esperimenti da compiere e i valori delle variabili per ogni esperimento, da randomizzare in modo da evitare possibili errori indotti da fattori ambientali, dagli strumenti utilizzati e dalla consequenzialità realizzativa degli esperimenti [87]. Alla realizzazione degli esperimenti segue l'analisi dei dati, il calcolo, la validazione e valutazione della capacità predittiva del modello. Qualora non si riesca nell'intento di validazione, il processo deve essere ripetuto da capo variando uno o più passaggi [88]. Esistono diversi modelli atti a stilare la matrice sperimentale, i più usati sono:

- DoE fattoriale: I disegni fattoriali completi prendono in considerazione le risposte per ogni combinazione di livelli assunti dai fattori. Il numero di esperimenti richiesti in un disegno fattoriale è pari a $I^n - P$ dove n sono le variabili testate, I il numero di livelli studiati e p il numero di variabili non indipendenti. In un disegno fattoriale completo, p è zero e ogni fattore è solitamente regolato su due livelli. Questo tipo di disegno richiede di valutare un numero di iterazioni via via crescente con l'aumentare dei livelli, per questo motivo spesso si ricorre al disegno fattoriale frazionario. Confondendo l'effetto di due o più variabili con le interazioni generate dalle stesse si riesce ad attuare una riduzione degli esperimenti da eseguire e ad ottenere delle informazioni sulle variabili principali del sistema.
- Design composito centrale (CCD): I disegni CCD sono disegni fattoriali parziali composti che richiedendo un numero di esperimenti inferiori rispetto ai fattoriali totali. Generalmente costituiti da 5 livelli ($-\alpha$, -1 , 0 , 1 e $+\alpha$), possono essere di tipo inscritto (CCI), circoscritto (CCC), a faccia centrata (CCF). Se invece assumono solo 3 livelli ($-1, 0, +1$) sono di tipo Box-Behnken Design (BBD) come mostrato in figura 3.3.

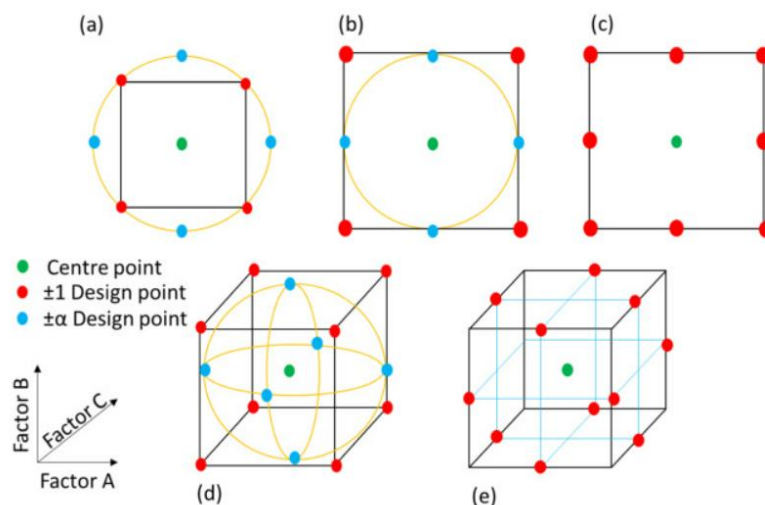


Figura 3.3: rappresentazione dei punti di progettazione per CCC a 2 variabili (a), CCI a 2 variabili (b), CCF a 2 variabili (c), CCC a 3 variabili (d), BBD a 3 variabili (e)[89]

Alla fase di sperimentazione segue l'analisi e l'interpretazione dei risultati al fine di determinare le variabili che influenzano o ottimizzano il processo in esame. In questa fase viene valutata la capacità predittiva del modello. A tale scopo si utilizzano:

- *La regressione multilineare*

La regressione multilineare viene utilizzata per l'analisi dei disegni fattoriali. Attraverso un'approssimazione polinomiale di primo grado si va a modellizzare la relazione, adattata sui dati osservati grazie agli esperimenti effettuati, tra le variabili di input e la risposta. La regressione lineare di una variabile dipendente y è data dall'equazione 3

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_ix_i \quad (3)$$

Dove:

x_i è il valore dell' i -esimo predittore,

b_0 è la costante di regressione,

b_i è il coefficiente dell' i -esimo predittore.

- *La superficie di risposta*

Con l'aggiunta di un termine quadratico si va a modellizzare la curvatura della risposta dei design CCD e BBD. Un'equazione che può essere utilizzata per rappresentare la superficie di risposta è data dall'equazione 3.1.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{i,j} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i^2 + \epsilon \quad (3.1)$$

Dove:

y è la variabile di risposta,

β_0 è il termine di offset,

β_i sono i coefficienti lineari

β_{ii} sono i coefficienti quadratici e coefficienti di interazione.

x_i e x_j sono variabili indipendenti [89]

Per semplificare e ridurre il numero di esperimenti necessari in questo tipo di modello spesso non vengono tenuti in considerazione i termini che modellano le interazioni tra termini lineari e quadratici.

3.3.1 DoE dei trattamenti al plasma da effettuare sulle membrane di PVDF

Per decidere quali esperimenti dovevano essere eseguiti sulle membrane per raggiungere lo scopo del lavoro è stato realizzato un DoE. La matrice sperimentale (Tabella 3.1) è stata stilata tenendo in considerazione dati presenti in letteratura sono riassunti nella Tabella 3.2 che segue, test preliminari e la possibilità di utilizzo di un impianto al plasma a bassa pressione semiautomatico Femto (Diener electronic GmbH & Co. KG, Germania) con le seguenti caratteristiche:

- Tipo di gas utilizzabili: Ar e O₂, puri o in miscela;
- Potenza del trattamento che varia nel range: 45-300 W;
- Pressioni operative: 0.1-0.5 mbar.

Tabella 3.1: prima matrice sperimentale codificata per i trattamenti sul PVDF

Tempo [s]	Potenza [W]	Argon in miscela con O ₂ (%)	Pressione [mbar]
-1	-1	-1	-1
+1	-1	-1	-1
-1	+1	-1	-1
+1	+1	-1	-1
-1	-1	+1	-1
+1	-1	+1	-1
-1	+1	+1	-1
+1	+1	+1	-1
-1	-1	-1	+1
+1	-1	-1	+1
-1	+1	-1	+1
+1	+1	-1	+1
-1	-1	+1	+1
+1	-1	+1	+1
-1	+1	+1	+1
+1	+1	+1	+1
-1	0	0	0
+1	0	0	0
0	-1	0	0
0	+1	0	0
0	0	-1	0
0	0	+1	0
0	0	0	-1
0	0	0	+1
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

Tabella 3.2: Parametri utilizzati in letteratura per i trattamenti al plasma in Ar e O₂ su PVDF

Autori	Potenza [W]	Durata [s]	Pressione [Pa]	Gas	WCA iniziale [°]	WCA finale [°]	Tipo di campione
Boulares-Pender et al [8]	5-7	300	24-26	Ar O ₂ /Ar (50/50) O ₂	138.3 ±0.4	132.9±1.6 126.0±2.9 65.1 ± 2.6	membrane
Duca et al [9]	25 -100	0-60	13.3	Ar	71	71-36	fogli
Yalcinkaya et al [10]	-	300 s	bassa	Ar	122.5	0	Membrane nanofibrose
Correia et al [11]	360	120 s	-	O ₂	-	0	fibre
Vandencastelle et al [12]	20	0-600	7	O ₂	68	36-9	fogli
Park et al [13]	25-100	0-180	13.3	O ₂	88	88-71	fogli

Per compilare la matrice sperimentale codificata, in cui l'estremo inferiore del range di variabilità di ogni fattore è indicato con “-1” e quello superiore con “+1”, ci si è assicurati che ogni trattamento avesse lo stesso numero di osservazioni al fine di eliminare ogni confusione ed avere informazioni su ogni effetto delle variabili di ingresso sulla risposta in uscita (Balanced Design) [87]. La matrice sperimentale è stata stilata utilizzando un modello di tipo Central Composite Design (CCD) con quattro input e valore dei punti a stella $\alpha = 1$. La variabilità e la curvatura della risposta sono state valutate aggiungendo un set di tre repliche di punti centrali, equidistanti dagli estremi dei livelli in cui variano i fattori, indicati con “0” nella matrice sperimentale. Il CCD (in figura 3.4) permette di costruire un modello del secondo ordine, senza dover utilizzare un esperimento fattoriale a 3 livelli, sfruttando i punti al centro del design, dove ogni fattore è la mediana dei valori utilizzati nella parte fattoriale, e i punti a stella per garantire che la varianza della risposta prevista dipenda esclusivamente dalla distanza dal punto centrale (ruotabilità rispetto agli assi).

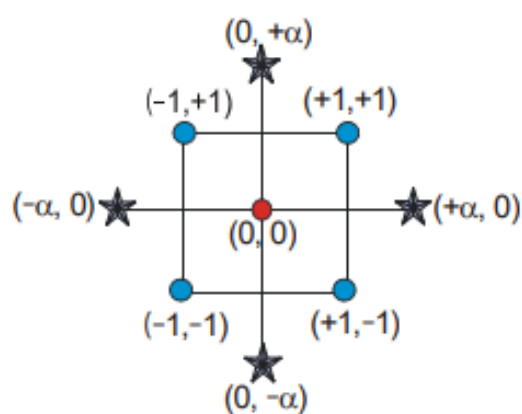


Figura 3.4: rappresentazione del modello di tipo CCD utilizzato per stilare la matrice sperimentale [90]

Le variabili e i range di funzionamento presi in esame per stilare la prima matrice sperimentale non codificata sono i seguenti:

- Tempo di trattamento: 30 s- 300s;

- Potenza di trattamento: 45-300 W;
- Percentuale di Argon presente in miscela con l'O₂: 0- 100 %. Questa scelta è stata adottata per riuscire a valutare l'effetto dei due gas sul trattamento con una sola variabile in ingresso anziché due;
- Pressione operativa: 0.1-0.5 mbar.

La risposta studiata è stato il valore di angolo di contatto. Eseguendo i primi test si è notato un ritiro delle membrane esposte ai trattamenti per tempi prolungati quindi si è deciso di diminuire il tempo dei trattamenti fino ad un massimo di 180 secondi (anziché 300 secondi) e di scalare di conseguenza il tempo dei punti intermedi (105 secondi e non più 165 secondi). Una volta randomizzata la matrice ed inserito per ogni slot giornaliero di prove un esperimento replica sono stati eseguiti tutti i trattamenti previsti dalla matrice sperimentale. Durante il processo per trovare un trattamento al plasma che garantisse un comportamento idrofilo della superficie, buona maneggiabilità delle membrane e ripetibilità delle caratteristiche indotte dalla modifica superficiale sono state utilizzate 8 matrici sperimentali di ottimizzazione dei parametri. Le combinazioni Tempo (s) - Potenza (W) testate, mantenendo fisse le variabili pressione (0.5 mbar) e gas (100% O₂), sono state le seguenti:

- 1) 30 ÷ 105 s - 45 ÷ 186 W;
- 2) 40 ÷ 90 s - 105 ÷ 186 W;
- 3) 45 ÷ 60 s - 90 W;
- 4) 300 ÷ 420 s - 60 ÷ 90 W;
- 5) 180 ÷ 300 s - 45 ÷ 60 W,
- 6) 150 ÷ 180 s - 45 ÷ 36 W;
- 7) 150 ÷ 90 s - 45 W;
- 8) 150 ÷ 180 s - 45 W.

Per stilare queste matrici è stato utilizzato un disegno fattoriale completo con l'aggiunta di tre repliche arbitrarie dei punti al centro. Tutte le matrici sono state costruite mantenendo fisse le variabili di input già ottimizzate (gas di utilizzo O₂ e pressione 0.5 mbar) e facendo variare entro range di funzionamento diversi quelle che necessitavano di ulteriori aggiustamenti (tempo e potenza di trattamento). La scelta delle variabili da modificare è stata eseguita attraverso l'osservazione diretta dei cambiamenti indotti dalle stesse sulle caratteristiche meccaniche e morfologiche delle membrane trattate al plasma. Da ognuna delle matrici, dopo aver svolto gli esperimenti e le dovute caratterizzazioni, è stato di volta in volta selezionato il trattamento che garantiva le migliori prestazioni. Per tutti questi trattamenti sono stati programmati dei test per valutare la ripetibilità (trattamenti con gli stessi parametri ma effettuati in giorni differenti) e di stabilità (misurazione dell'angolo di contatto dei campioni trattati a intervalli stabiliti per sette giorni). Procedendo in questo modo si è giunti al trattamento che garantisce tutte le specifiche desiderate.

3.3.2 DoE dei trattamenti al plasma da effettuare sui campioni di SILPURAN

Prima di trattare al plasma a bassa pressione i campioni di silicone è stato stilato un DoE. Per determinare le variabili in grado di massimizzare le informazioni sperimentali oltre ad una ricerca bibliografica sui protocolli utilizzati dai gruppi di ricerca per provare a rendere idrofila la superficie, riassunti in tabella 3.3, naturalmente idrofobica, del Silpuran sono state effettuate delle prove di trattamento combinando le condizioni di potenza massima (300W) e tempi di esposizioni lunghi (3-5 min). Questo lavoro ha portato alla selezione delle seguenti variabili e range operativi:

- Tempo di trattamento: 30 s- 180s;
- Potenza di trattamento: 45 W-210 W;
- Pressione operativa: 0.1-0.5 mbar;
- Gas scelto per i trattamenti dei campioni di silicone è stato l'Ossigeno, in questo modo è stata eliminata una variabile di ingresso.

Tabella 3.3: Parametri utilizzati in letteratura per i trattamenti al plasma in Ar e O₂ su silicone

Gruppo	Tempo [s]	Potenza [W]	Pressione	Gas	Tipo di campione	Risultati
Duangkanya et al.[91]	0, 6, 12, 18 e 24 s	200		O ₂	film di PDMS spessi 43 ± 1,44 e 15 ± 1,17 µm	Angolo di contatto 52° dopo 24 s, ruvidità superficiale film sottili aumenta con il tempo, film sottili con angolo di contatto <
Butrón-García et al.[92]	120 s	25	300 mTorr	93% volume ossigeno + 7% argon	film di PDMS	LLP durato >14 giorni in aria, sopra 400 mTorr c'è recupero idrofobico, la durata del trattamento è il fattore più influente sulla bagnabilità
Zahid et al.[93]	180	15	6 Torr	O ₂	Campioni PDMS metà ruvidi e metà lisci	La rugosità della superficie piana aumenta mentre quella della superficie ruvida diminuisce
Williams et al.[94]	60	<1	8*10 ⁻² mbar	O ₂ , Ar, N ₂ e NH ₃	Film rettangolari (10-20 mm) per esperimenti fisico-chimici e circolari di 25 mm di diametro per analisi biologiche	Microfessurazioni dopo trattamento O ₂ e Ar--> tensione + superfici meno emocompatibili; Rottura legame Si-O con N ₂ e NH ₃
Hong Zhao et al. [95]	300, 600 e 900	10,5 W (media potenza) o 18W (alta potenza)		O ₂	film PDMS (Sylgard® 184 Silicone)	meglio alta potenza e 15 minuti nella diminuzione dell'angolo di contatto; campioni in LB-->wca 10-20° dopo 7giorni; in acqua 20-30° dopo 7gg; in aria da 40 -->80° dopo soli 30 min e >100 dopo 1 settimana

Anche in questo caso la risposta valutata è l'angolo di contatto. Per stilare la matrice sperimentale è stato usato un disegno fattoriale completo a tre variabili e due livelli (+1 e -1) per valutare contemporaneamente l'effetto degli input sulla risposta. Alle otto repliche richieste dal disegno fattoriale sono state aggiunte tre ripetizioni nel punto al centro (media tra gli estremi delle variabili) per permettere di valutare la presenza di una deviazione dal modello di

regressione lineare e ottenere una stima più precisa dell'errore sperimentale. È stata ottenuta così una matrice di undici righe e tre colonne (Tabella 3.4) che è stata randomizzata prima di procedere ai trattamenti superficiali selezionati.

Tabella 3.4: prima matrice sperimentale codificata per i campioni silicone

Tempo [s]	Potenza [W]	Pressione [mbar]
-1	-1	-1
+1	-1	-1
-1	+1	-1
+1	+1	-1
-1	-1	+1
+1	-1	+1
-1	+1	+1
+1	+1	+1
0	0	0
0	0	0
0	0	0

L'analisi dei dati sperimentali e, successivamente, le stime dei modelli di regressione sia per i trattamenti sulle membrane di PVDF che sui substrati in silicone sono stati realizzati utilizzando il software CAT (Chemometric Agile Tool) [96]. La determinazione dei coefficienti dell'equazione dei modelli è stata effettuata selezionando i seguenti parametri: misure indipendenti, 2 gradi di libertà, deviazione standard degli esperimenti pari a 5 e trascurando le interazioni a tre componenti. I coefficienti delle equazioni di regressione sono stati rappresentati attraverso dei diagrammi. I modelli ottenuti sono stati rappresentati graficamente mediante superfici di risposta bidimensionale e tridimensionale che hanno permesso di visualizzare l'andamento dei valori predetti dal modello per le condizioni interne al dominio sperimentale.

3.4 Trattamenti al plasma

Una delle fasi più delicate dell'impianto di un dispositivo in un sistema biologico è la risposta immunitaria che si innesca nell'organismo quando la superficie dello stesso viene in contatto con i fluidi corporei, infatti, da questa spesso dipendono durata e corretto funzionamento. Con i trattamenti al plasma a bassa pressione si va a modificare la chimica e/o la fisica superficiale con una profondità che va da centinaia di Angstrom fino a dieci micron mantenendo intatte le proprietà degli strati massivi. La modifica superficiale avviene attraverso l'uso di gas ionizzati resi altamente reattivi con l'apporto di energia in un ambiente in cui viene creato il vuoto. Questa tecnica è stata scelta poiché offre la possibilità di pulire il campione dai residui di contaminazione molecolare e attraverso l'attivazione garantisce di migliorare la bagnabilità della superficie.

Per effettuare i trattamenti è stato utilizzato un impianto al plasma a bassa pressione Femto (Diener electronic GmbH & Co. KG, Germania) (in figura 3.5) con le seguenti caratteristiche:

- Tipo di gas utilizzabili: Ar e O₂,
- Generatore RFG 13.56 / 300,
- Potenza del trattamento variabile nel range: 0-300 W,

- Pressioni operative: 0.02-0.7 mbar,

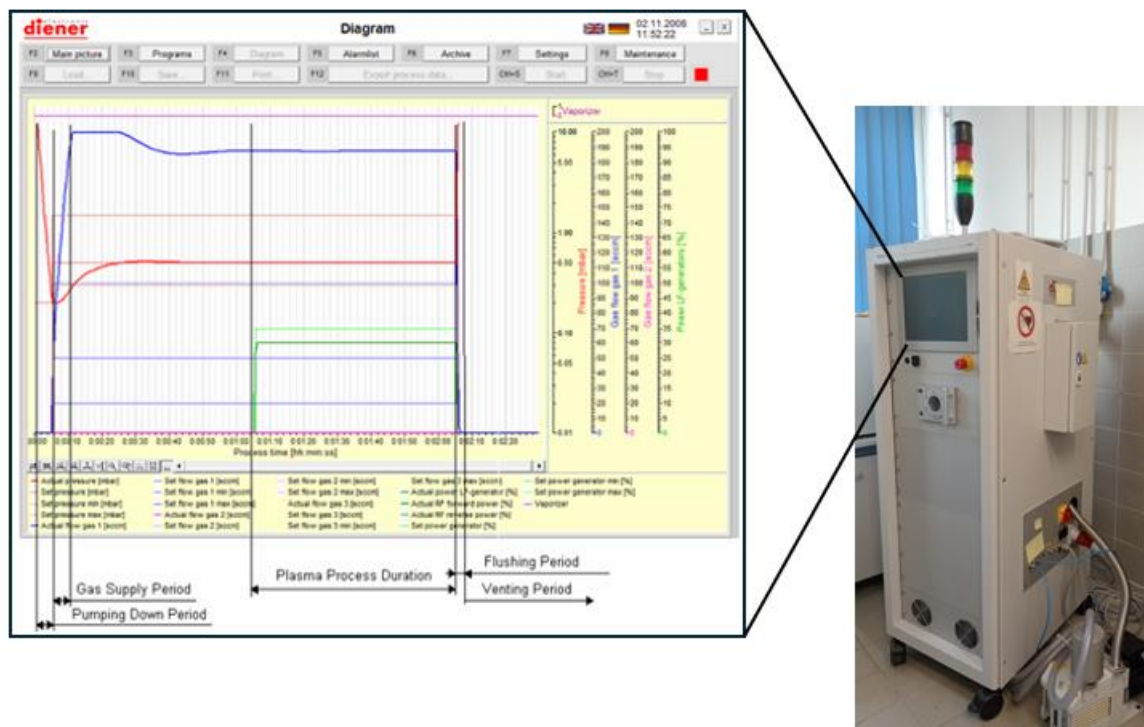


Figura 3.5: impianto al plasma a bassa pressione Femto (Diener electronic GmbH & Co. KG, Germania) usato per questo lavoro di tesi

Per trattare i campioni di PVDF e Silpuran è stato utilizzato lo strumento in modalità automatica usufruendo di programmi opportunamente impostati. Ogni programma di trattamento al plasma prevede il susseguirsi di cinque fasi di processo tutte completamente programmabili.

1. **Svuotamento:** la camera viene svuotata da una pompa per il vuoto fino a raggiungere un livello di vuoto prefissato, inferiore a quello di lavoro. Di questa fase è possibile impostare la pressione.

2. **Immissione del gas:** la miscela di gas scelta per il trattamento viene immessa nella camera fino a raggiungere la pressione di lavoro. In questo step è possibile impostare la miscela di gas, il tempo che intercorre tra la prima apertura dei regolatori di portata massica e l'accensione del generatore. Questo serve per stabilizzare l'atmosfera di processo. L'ultima voce impostabile in questa sezione è la pressione di processo desiderata e la sua deviazione massima. Se il regolatore di pressione è acceso, la pressione impostata verrà utilizzata come valore di riferimento per il regolatore.

3. **Processo al plasma:** durante il quale avviene il vero e proprio trattamento. In questo step bisogna impostare la durata del processo, la potenza con la sua deviazione massima e il tempo oltre il quale devono iniziare i monitoraggi della pressione, dei flussi di gas e della potenza effettiva in camera.

4. **Tempo di spurgo/degasaggio:** il gas di spurgo viene immesso nella camera e contemporaneamente eventuali gas di processo nocivi vengono eliminati. In questo passaggio

viene richiesto di impostare la durata in cui è attiva la pompa per il vuoto e quella in cui avviene il flussaggio.

5. Tempo di ventilazione: gas ambientali vengono immessi nella camera per portarla a pressione ambiente. Dopo questa fase è possibile aprire la camera.

I trattamenti da effettuare si differenziavano uno dall'altro per: tempo di trattamento, potenza di trattamento, percentuale di Argon presente in miscela con O₂ e pressione operativa. Per la formulazione dei programmi automatici sono stati scelti dei parametri di flusso che garantissero la pressione di trattamento desiderato. Dopo aver scelto il/i gas da utilizzare sono state effettuate delle prove con lo strumento in modalità manuale ed è stato visualizzato tramite il diagramma a schermo il flusso in sccm che garantiva il raggiungimento della pressione di trattamento prefissata. Per effettuare tutti i trattamenti previsti sono stati impostati tre programmi per ogni gas o miscela selezionata:

- 100% OSSIGENO: 0.1 mbar, 0.3 mbar, 0.5 mbar;
- 100% ARGON: 0.1 mbar, 0.3 mbar, 0.5 mbar;
- MISCELA 50% Ar e 50% O₂: 0.1 mbar, 0.3 mbar, 0.5 mbar.

Il tempo e la potenza sono stati modificati di volta in volta, prima dell'avvio del trattamento da effettuare.

I campioni, ricavati tagliando in quadrati di 1cm circa per lato le membrane di PVDF elettrospinnate comprensive del foglio in alluminio su cui erano state raccolte, sono stati trattati tra due dischi di silicone (come mostrato in figura 3.6 A) per mantenere fermi i campioni in camera ed evitare che volassero sotto l'effetto della pompa a vuoto. Sul disco superiore sono stati praticati tre fori circolari passanti in modo da non inficiare il trattamento superficiale. Il disco inferiore, invece, è stato posto in contatto con il vassoio portacampioni.

I campioni di silicone sono stati posti sul fondo di una piastra di Petri per evitare il contatto diretto con il vassoio portacampioni (come mostrato in figura 3.6 B)

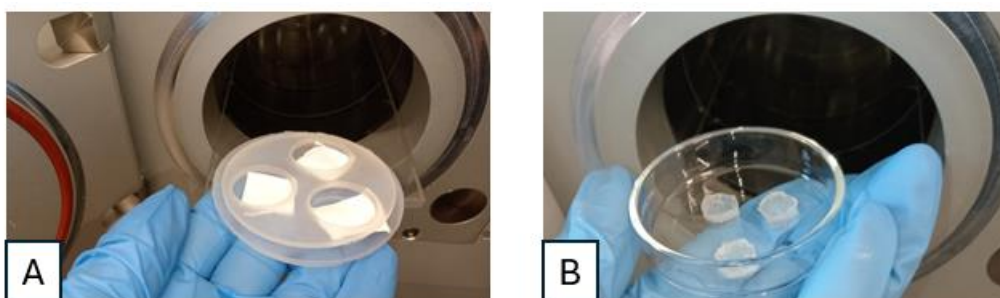


Figura 3.6: campioni di PVDF (A) e di Silpuran(B) da trattare al plasma

Tutte le membrane alla fine del processo sono state coperte con dell'alluminio e riposte in buste di plastica opportunamente etichettate prima che su di esse venissero eseguiti i test opportuni.

3.5 Angolo di contatto

Per valutare le modifiche superficiali apportate dal plasma, vedere come i biomateriali interagiscono con i fluidi pre e post trattamento è stata effettuata una misurazione dell'angolo di contatto. Quando una goccia di un liquido viene depositata sulla superficie solida di un

materiale si creano delle forze di adesione liquido-solido responsabili della forma assunta dalla goccia stessa. L'angolo che la goccia forma con la superficie solida è indice della bagnabilità del materiale. La legge di Young (3.2) descrive la relazione tra le tensioni superficiali che coinvolgono le tre superfici (gas- liquido- solido) e l'angolo di contatto:

$$\gamma_{GS} = \gamma_{LS} + \gamma_{GL} * \cos \theta \quad (3.2)$$

Dove:

θ è l'angolo di contatto solido-liquido,

γ_{GS} è la tensione superficiale tra gas e superficie solida,

γ_{LS} è la tensione superficiale tra gas e liquido,

γ_{GL} è la tensione superficiale tra acqua e superficie solida.

Si possono verificare 3 diverse condizioni (figura 3.7): se l'angolo di contatto è inferiore a 90° la superficie viene definita idrofila; tra 90° e 150° la superficie viene definita idrofobica mentre se è maggiore di 150° la superficie viene definita superidrofobica.

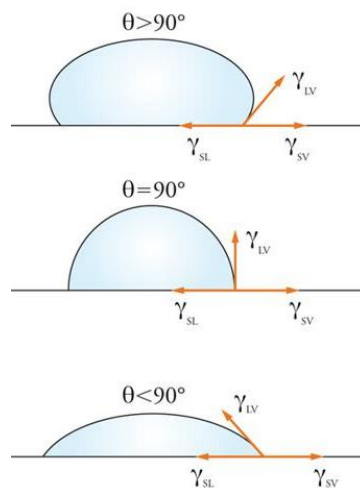


Figura 3.7: schema angolo di contatto e tensioni superficiali [97]

3.5.1 Misurazione dell'angolo di contatto statico

Le misure di angolo di contatto statiche sono state condotte utilizzando lo strumento Drop Shape Analyzer – DSA100S (KRÜSS, Germania) in figura 3.8. Lo strumento è dotato di una sorgente di luce LED monocromatica a bassa emissione di calore, una telecamera con funzione di rivelatore che è collegata ad un software dedicato che calcola l'angolo di contatto in maniera predefinita ed automatizzata, un portacampioni mobile ed orientabile lungo tre direzioni e permette un range di misura dell'angolo di contatto che va da 0 a 180° con risoluzione 0.1° . Come liquido bagnante è stata utilizzata l'acqua distillata. Tutte le valutazioni, sia per le membrane di PVDF che per i substrati siliconici, sono state effettuate in modalità manuale depositando 3 gocce da $10\mu\text{l}$ ciascuna avvalendosi dell'uso di una pipetta. Le gocce sono state depositate in punti sempre diversi del campione al fine di evitare il contatto con superfici già bagnate. La misura dell'angolo di contatto è stata registrata 15 secondi dopo la deposizione della goccia sulla superficie in modo che questa si assestasse sotto l'effetto della tensione

superficiale e della forza di gravità. Una volta raccolte le tre misurazioni per ogni campione è stato calcolato l'angolo di contatto medio con la relativa deviazione standard.



Figura 3.8: Drop Shape Analyzer – DSA100S (KRÜSS, Germania)

3.5.2 Misurazione del tempo di residenza

Per valutare ulteriormente l'idrofilicità e la bagnabilità delle membrane sottoposte alla modifica superficiale sono state eseguite delle valutazioni del tempo di residenza della goccia sessile. Per ogni trattamento al plasma selezionato sono stati valutati 3 campioni di membrana di PVDF. Su ogni campione quadrato di lato 1 cm*1cm è stata depositata attraverso una micropipetta una goccia da 10 μ l di acqua distillata (Sigma-Aldrich®). Per ogni misurazione è stato effettuato un video che è stato analizzato a rallentatore per poter determinare il tempo intercorso tra la deposizione e il completo assorbimento della goccia. Una volta raccolte le tre misurazioni è stato calcolato il tempo di residenza medio con la relativa deviazione standard.

3.6 Caratterizzazione morfologica tramite microscopia a scansione elettronica (SEM)

La microscopia elettronica sfrutta l'interazione tra un fascio di elettroni e gli atomi che compongono il campione in esame per caratterizzarlo morfologicamente. Utilizzando elettroni che, rispetto ai fotoni (luce visibile: 400-700 nm) utilizzati nella microscopia ottica, hanno una lunghezza d'onda di tre ordini di grandezza inferiore, permette di ottenere immagini con un potere risolutivo elevato (10 nm) e una maggior profondità di campo. Di solito il fascio di elettroni ha un'energia che varia nell'intervallo compreso tra 0,1 e 30 keV. Solo una percentuale inferiore all'1% degli elettroni emessi dalla sorgente giunge sul campione poiché nella colonna entro cui avviene il percorso ottico si trovano lenti magnetiche affiancate da aperture al fine di avere una sonda che interagisce con il campione con intensità dell'ordine dei nanoampere e del diametro di poche decine di nm. La scansione avviene in maniera sequenziale ed interessa una serie di posizioni ravvicinate ma discrete della superficie del campione. Questa operazione è controllata tramite un generatore di scansione sincronizzato con il monitor sul quale si osserva l'immagine. L'interazione del fascio con il campione produce due tipi di elettroni in uscita:

- 1) retrodiffusi ovvero quegli elettroni del fascio che emergono dal campione conservando gran parte dell'energia incidente;
- 2) gli elettroni secondari che vengono espulsi dalla superficie con energie cinetiche molto basse (0-50 eV).

I segnali prodotti dagli elettroni di entrambi i tipi vengono misurati utilizzando dei rilevatori al fine di costruire, pixel per pixel, un'immagine in scala di grigi. Sia la colonna che la camera dove vengono posizionati i campioni funzionano in condizioni di alto vuoto per ridurre al minimo fenomeni di scattering ed interferenza. I campioni isolanti devono essere rivestiti con uno strato conduttivo messo a terra per eliminare l'accumulo della carica superficiale che non permetterebbe la visualizzazione degli stessi [98].

Per questo lavoro di tesi la caratterizzazione morfologica dei campioni di PVDF e di silicone medico è stata effettuata con il microscopio a scansione elettronica Phenom XL (Phenom-World B.V., Paesi Bassi) in figura 3.9.



Figura 3.9: SEM Phenom XL utilizzato per la caratterizzazione morfologica

▪ PVDF

Al fine di valutare la morfologia, il diametro, la disposizione e l'orientamento delle fibre delle matrici pre e post trattamento al plasma sono stati acquisiti delle immagini al SEM. La preparazione dei campioni per la caratterizzazione morfologica è stata effettuata ricavando porzioni quadrate di dimensioni ridotte da ciascuna membrana (con annesso supporto in alluminio) successivamente fissate alla superficie degli stub per mezzo di nastro biadesivo in carbonio. Sui campioni così ottenuti è stato depositato un sottile strato conduttivo di platino con il rivestitore Q150T S (Quorum Technologies, Regno Unito). Le immagini sono state acquisite a diversi ingrandimenti (2000x, 5000x, 10000x) e tensione del fascio di 10 kV. Per valutare le dimensioni dei diametri delle fibre, le immagini ottenute sono state esaminate attraverso il software ImageJ valutando 250 diametri per ogni campione.

- Silpuran

I campioni di silicone prima di essere sottoposti ad una procedura di sputtering di uno strato conduttivo superficiale in platino, sono stati incollati agli stub con una colla contenente microaghi d'argento (Ted Pella Inc, PELCO Colloidal Silver Paste). Con la stessa colla è stato creato un ponte conduttivo che collegasse la superficie superiore di ogni campione con la base dello stub su cui era stato posto. Le immagini sono state acquisite a diversi ingrandimenti (7000x, 9000x, 20000x, 50000x) impostando una tensione del fascio di 15 kV.

Per valutare la rugosità superficiale dei campioni di silicone medico, le immagini ottenute al SEM sono state esaminate attraverso l'apposito software in dotazione, selezionando, oltre alla ricostruzione/mappatura automatica della superficie, tre diverse direzioni lungo cui ottenere il valore di S_a medio e la relativa deviazione standard.

3.7 Caratterizzazione chimico-fisica

3.7.1 Spettroscopia infrarossa FTIR-ATR

La spettrofotometria infrarossa in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR) è una tecnica spettroscopica di assorbimento che sfrutta l'interazione di una radiazione IR incidente con il materiale in esame al fine di determinarne la composizione, la struttura molecolare e i legami chimici. La radiazione IR di interesse pratico è la zona compresa tra i 400 e 4000 cm^{-1} . Una molecola che assorbe un fotone IR passa da uno stato vibrazionale fondamentale ad uno eccitato e queste transizioni vibrazionali possono interessare la lunghezza di legame (stretching simmetrico o asimmetrico) e l'angolo di legame (bending simmetrico e asimmetrico nel piano o fuori dal piano). Ogni transizione tra livelli vibrazionali è possibile solo ad una specifica lunghezza d'onda e andrà a determinare dei picchi di assorbimento che comporranno uno spettro. Un tipico spettro ha dei picchi caratteristici dei gruppi funzionali che ricadono sempre alle stesse frequenze e una zona di "finger-print" che permette di discriminare le diverse molecole. Lo strumento con cui vengono effettuate le analisi IR è lo spettrofotometro. Lo spettrofotometro registra la radiazione IR che arriva, scomposta nelle varie componenti spettrali grazie ad un prisma o reticolo monocromatore, al detector dopo aver interagito con il campione. Il rivelatore non solo raccoglie la radiazione monocromatica incidente istante per istante (scansione) ma converte il segnale ottico in un segnale elettrico. Quest'ultimo dopo essere stato amplificato va a rappresentare lo spettro. Gli spettri possono essere registrati in trasmittanza $T = I/I_0$ (percentuale di radiazione che viene lasciata passare dal campione ad una determinata lunghezza d'onda) o in assorbanza ($A = -\log(T)$). Ad oggi gli spettrometri a trasformata di Fourier vengono preferiti, per prestazioni, a quelli con monocromatore. Utilizzando la trasformata di Fourier nell'analisi spettrofotometrica si possono infatti scansionare tutte le frequenze della sorgente IR con un buon rapporto segnale rumore, in tempi ridotti e con potere risolutivo costante lungo tutto lo spettro. La radiazione IR policromatica emessa dalla sorgente, con intensità costante, viene divisa per mezzo di uno specchio semiriflettente in due raggi: uno inviato ad uno specchio fisso e l'altro ad uno specchio mobile. I due raggi giungono al rivelatore dopo aver interagito con il campione ed essere stati nuovamente ricongiunti dallo specchio semiriflettente. Negli strumenti utilizzati per fare FT-IR al posto del monocromatore si ha un interferometro di Michelson che durante la scansione produce l'interferogramma ovvero il grafico che contiene il segnale complessivo delle interferenze costruttive o distruttive, a seconda della differenza di cammino ottico, dei due raggi che arrivano al rivelatore.

All'interferogramma viene applicata una Trasformata di Fourier per ottenere la variazione dell'intensità del segnale in funzione del numero d'onda (spettro). Quando si vuole acquisire lo spettro IR di una sostanza opaca o di un campione particolarmente difficile da preparare è possibile utilizzare l'analisi in riflettanza basata sul fenomeno della riflessione. Una tecnica usata a tale scopo è l'ATR[99]. Gli spettri IR acquisiti mediante tecnica ATR prevedono che il campione sia in contatto diretto e stabile con un cristallo affinché l'onda evanescente proveniente dal materiale a più basso indice di rifrazione abbia la capacità di penetrare nel campione. L'onda evanescente, infatti, decade esponenzialmente con la distanza. Il cristallo dell'ATR è costituito da materiale trasparente all'IR (solitamente ZnSE, ZNS, Ge, Si o diamante) con elevato indice di rifrazione per permettere la riflessione totale del raggio IR. Il raggio incidente prima di essere raccolto sul rivelatore subisce molteplici riflessioni e si attenua interagendo con il campione. Appositi software restituiscono lo spettro dell'assorbanza o della trasmittanza in funzione del numero d'onda eseguendo molteplici scansioni del campione in esame. La caratterizzazione chimico/fisica delle membrane di PVDF e dei substrati siliconici è stata effettuata tramite spettroscopia infrarossa FTIR-ATR. Per ricavare gli spettri di interesse è stato utilizzando lo spettrometro FTIR Tensor 27 (Bruker Optics) con uno strumento ATR con cristallo di ZnSE (SensIR Technologies) che consente visualizzare i picchi di assorbimento caratteristici delle vibrazioni dei legami compresi tra i 4000 e i 600 cm^{-1} con una risoluzione spettrale di 2 cm^{-1} , per ogni spettro sono state acquisite 64 scansioni.

- PVDF

I campioni di membrana sono stati adagiati sul porta-campione con il supporto in alluminio. Ci si è serviti di una spatola, da interporre tra il campione ed il pistone dello strumento, per applicare una pressione omogenea e massimizzare il contatto fra il materiale e la superficie del cristallo (figura 3.10).

Per le membrane di PVDF è stata eseguita inoltre una quantificazione delle fasi α , β e γ sfruttando le loro bande tipiche a 763, 1275 e 1234 cm^{-1} . Le formule utilizzate a tale scopo sono le seguenti (3.3,3.4,3.5) [70]:

$$F_{EA} = \frac{I_{EA}}{\left(\frac{k_{840}}{k_{763}}\right) I_{763} + I_{EA}} \times 100\% \quad (3.3)$$

Dove:

F_{EA} fase elettroattiva β e γ

I_{EA} e I_{763} sono le assorbanze a 840* e 763 cm^{-1}

K_{840*} e K_{763} sono i coefficienti di assorbimento a 840* e 763 cm^{-1} , rispettivamente $7,7 \times 10^4$ e $6,1 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

$$F(\beta) = F_{EA} * \left(\frac{\Delta H_{\beta'}}{\Delta H_{\beta'} + \Delta H_{\gamma'}} \right) * 100\% \quad (3.4)$$

$$F(\gamma) = F_{EA} * \left(\frac{\Delta H_{\gamma'}}{\Delta H_{\beta'} + \Delta H_{\gamma'}} \right) * 100\% \quad (3.5)$$

Dove:

$\Delta H_{\beta'}$: differenza di altezza (assorbanza) tra il picco attorno a 1275 cm^{-1} e la valle più vicina attorno a 1260 cm^{-1}

$\Delta H_{\gamma'}$: differenza di altezza (assorbanza) tra il picco attorno a 1234 cm^{-1} e la valle più vicina intorno a 1225 cm^{-1}

- Silicene

I campioni di silicene sono stati mantenuti nella posizione che garantiva la massimizzazione del contatto campione-cristallo mediante il pistone dello strumento ATR.

Tra una misurazione e l'altra è sempre stata eseguita una pulizia del cristallo con acetone o etanolo e un'acquisizione del background. Le analisi sono state eseguite in triplicato in modo da poter valutare uno spettro medio per ogni campione. Gli spettri sono stati graficati con il software Origin per poter valutare la presenza e le eventuali differenze dei picchi di assorbimento dei due materiali pre e post trattamento al plasma.

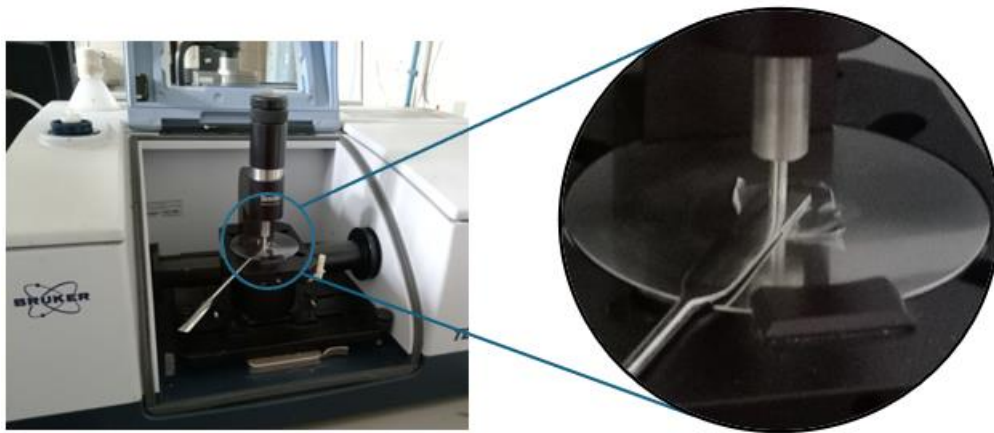


Figura 3.10: strumento FTIR-ATR utilizzato per questo lavoro di tesi

3.7.2 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)

La spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) nota anche come ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) è una tecnica di analisi superficiale, sensibile a una profondità compresa tra 1 e 10 nm, utilizzata per identificare e quantificare la composizione e le interazioni tra le specie chimiche di un materiale. Una sorgente di raggi X acromatica o monocromatica ($\text{AlK}\alpha$ o $\text{MgK}\alpha$) che irradia la superficie di un campione con energia pari a $E = h\nu$ (con h = costante di Plank; ν =frequenza della radiazione) può indurre il processo di fotoemissione. La fotoemissione consta di tre passaggi:

- 1) fotoeccitazione ovvero la probabilità che avvenga trasferimento di energia tra il fotone e l'elettrone colpito, dipende dallo stato di valenza del materiale e dall'energia del fascio incidente.

- 2) Trasporto verso la superficie. Solo gli elettroni che hanno un'interazione con il materiale da cui provengono simile a quella degli elettroni liberi e che non subiscono urti anelastici che ne riducono l'energia sono di interesse per l'analisi XPS.
- 3) Emissione. La superficie del campione si pone come una barriera di potenziale da cui fuoriescono solo gli elettroni più energetici.

L'effetto della fotoemissione è descrivibile attraverso la legge di conservazione dell'energia (formula 3.6).

$$E_k = h\nu - E_B - \Phi \quad (3.6)$$

L'energia di legame degli elettroni degli atomi del campione (E_B), quantificabile misurando l'energia cinetica degli elettroni fotoemessi (E_k), è uguale alla differenza tra lo stato di energia finale dell'atomo ionizzato e lo stato energetico iniziale dell'atomo bersaglio meno la funzione lavoro, ovvero l'energia minima con cui i fotoni riescono a rimuovere gli elettroni. Il fotone incidente può avere un'energia sufficiente a far fuoriuscire non solo gli elettroni dai livelli energetici superiori ma anche quelli di core. Dopo che il fotoelettrone abbandona il materiale quest'ultimo rimane nello stato eccitato finché non termina il processo di rilassamento elettronico noto come effetto Auger. La vacanza lasciata dall'elettrone di core espulso viene colmata da un elettrone di uno strato energetico più esterno, quest'ultimo rilascia energia che viene trasferita ad un terzo elettrone (di Auger) che riuscirà ad essere emesso a sua volta. Se ad essere espulso nel meccanismo competitivo innescato dalla metastabilità dell'atomo è un fotone il processo di rilassamento verrà denominato fotoluminescenza. Questa tecnica richiede un vuoto ultraelevato (1×10^{-7} Pa) nella camera di analisi per ridurre al minimo il rischio di contaminazione del campione e massimizzare il numero di fotoelettroni che raggiungono il rivelatore. Nella spettroscopia di fotoemissione XPS vengono utilizzate sorgenti di raggi X con energia costante, solitamente alluminio $K\alpha$ e magnesio $K\alpha$ con $h\nu = 1486.6$ e 1253.6 eV [100]. Gli elettroni espulsi dal campione vengono raccolti da un sistema di lenti elettroniche o elettromagnetiche (sistema di focalizzazione) prima di essere indirizzati ad un filtro di energia cinetica costituito da un condensatore emisferico a doppia armatura da cui fuoriescono solo gli elettroni che hanno un'energia pari alla pass energy impostata. Gli elettroni che sono riusciti a percorrere il cammino emisferico giungono ad un rivelatore che è in grado di moltiplicare la corrente (ordine dei picoAmpere) generata dagli elettroni che giungono su di esso ed ottenere una misurazione precisa. Dall'analisi dell'energia cinetica degli elettroni emessi dalla superficie del campione si va a comporre uno spettro che riporta il numero di elettroni raccolti dall'analizzatore in funzione del BE che avevano nel materiale [101]. Ogni elemento ha dei picchi caratteristici: la posizione del picco sull'asse x dello spettro determina la presenza dell'elemento e il suo stato chimico mentre l'area/intensità del picco è indice della quantità relativa dello stesso nella composizione [102].

L'analisi XPS per questo lavoro di tesi è stata effettuata mediante l'utilizzo di uno spettrometro PHI 5000 Versa Probe (Physical Electronics, Feldkirchen, Germania), che sfrutta una radiazione monocromatica Al $K\alpha$ (1486,6 eV). Gli spettri sono stati raccolti con un intervallo di energia passante pari a 187.75 eV, angolo di fotoemissione di 45° e diametro dello spot dei raggi X di 100 μm . Gli spettri ad alta risoluzione del C1s che risultavano shiftati sono stati riportati a

284,8eV al fine di eliminare possibili effetti di carica. Per la rappresentazione e la deconvoluzione dei picchi è stato utilizzato il software CasaXPS®. Per determinare la regione/area dei picchi su cui effettuare la deconvoluzione è stato scelto una linea di base tipo Shirley che risulta essere molto sensibile. Il processo di deconvoluzione vero e proprio è stato effettuato utilizzando un numero sufficiente di curve GL (30). Le curve GL sono combinazioni della funzione Gaussiana e Lorentziana che tengono conto della risposta dello strumento utilizzato e della relazione tra il tempo di vita degli stati eccitati e l'energia degli elettroni espulsi nel fenomeno di ionizzazione

3.8 Test meccanici

Per ottenere delle informazioni sulle proprietà meccaniche delle membrane di PVDF pre e post trattamento al plasma sono state eseguite delle prove a trazione. Si tratta di prove distruttive in cui un provino adeguatamente modellato (osso di cane) viene sottoposto ad un carico mono assiale crescente. Possono essere svolte in controllo di forza o spostamento ma in entrambi i casi quello che verrà valutato sarà la curva sforzo-deformazione (figura 3.11). Dalla curva s vs e è possibile valutare:

- **Il modulo elastico o modulo di Young (E)** che può essere quantificato osservando la pendenza del tratto iniziale della curva dove il campione ha ancora comportamento elastico e vale la legge di Hooke ($E = s/e$). Indice della rigidità del materiale in esame, rappresenta il rapporto tra la forza applicata per unità di area ($s=F/A$) e la deformazione ($e = \Delta l/l_0$).
- **Il carico di snervamento** in concomitanza del quale la deformazione non è più reversibile. Superato il carico di snervamento il materiale avrà comportamento plastico permanente. Continuando con la prova, il provino subirà una brusca diminuzione della sezione trasversale (strizione).
- **Il carico di rottura** che rappresenta il valore limite che pone fine alla prova.
- Altri parametri che possono essere valutati con una prova di trazione sono: il carico unitario di snervamento, l'allungamento percentuale e la strizione percentuale [103].

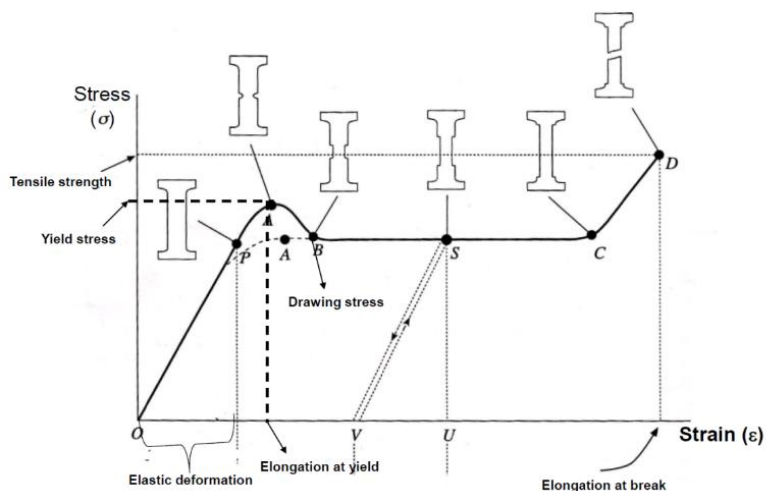


Figura 3.11: curva sforzo deformazione [104]

Per questo lavoro di tesi le membrane sono state testate a trazione secondo normativa ISO 527-5A per valutare il modulo elastico, la resistenza e l'allungamento a rottura. La normativa prevede l'utilizzo di un provino ad osso di cane (come quello in figura 3.12) che dev'essere portato a rottura imponendo una deformazione costante pari a 10 mm/min. I provini sono fissati allo strumento punzonando direttamente la membrana. Prima di ogni prova è stata effettuata la misurazione dello spessore di ogni provino. Lo strumento utilizzato è una macchina a trazione Instron 5966, equipaggiata con una cella di carico di 50 N e due afferraggi con chiusura ad aria compressa. La pressione di chiusura impostata è pari a 2 bar e la distanza iniziale tra gli afferraggi è di 5 cm. Per rimuovere eventuali effetti di disallineamento è stato impostato un precarico pari a 0.1 N. Per ogni campione sono state eseguite almeno 5 prove. Una volta ottenute le curve s vs e e per ogni prova effettuata, sono stati valutati i parametri di interesse.

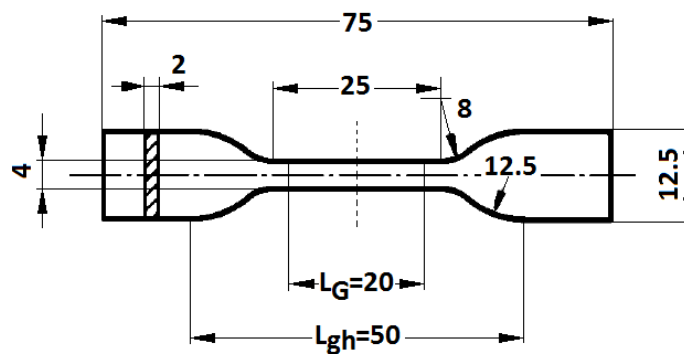


Figura 3.12: schema di un provino ad osso di cane utilizzato per i test a trazione delle membrane di PVDF

3.9 Test di stabilità a 28 giorni e 3 mesi

Per i due trattamenti che avevano mostrato le migliori capacità di indurre caratteristiche idrofile alle membrane, buona maneggiabilità post trattamento, ripetibilità e riproducibilità delle caratteristiche chimico-fisiche sono stati effettuati dei test di stabilità del trattamento a 28 giorni e 3 mesi. Sono stati scelti tre diversi modi di conservazione delle membrane post trattamento: aria, vuoto e TRIZMA. La valutazione della stabilità del trattamento è stata effettuata attraverso la misurazione dell'angolo di contatto statico e con la valutazione del tempo di residenza della goccia sessile sulle membrane (con le stesse modalità descritte al paragrafo 3.4.1 e 3.4.2). Per ogni metodo di conservazione sono stati trattati 6 campioni (1 cm*1 cm circa ciascuno): 3 campioni da valutare dopo 28 giorni e 3 allo scadere dei 90 giorni.

ARIA: I campioni di membrana destinati al test della durata della modifica superficiale dopo esposizione in aria sono stati posti sul fondo di contenitori in plastica chiusi con tappo a vite, per evitare il contatto con la polvere, contaminazione organica e umidità, subito dopo il trattamento al plasma. Ogni campione è stato posto con il foglio di alluminio a contatto con il contenitore e la superficie superiore (fibre) esposta all'aria facendo attenzione al fatto che i tre campioni non si sovrapponevano.

VUOTO: I campioni da valutare dopo la conservazione in vuoto sono stati posti uno alla volta, con l'uso di pinzette, in contenitori in vetro chiusi con un tappo in gomma. Ci si è assicurati una chiusura ermetica grazie all'applicazione di un colletto metallico con una ghiera. Ogni contenitore è stato collegato alla pompa a vuoto da laboratorio VCP 80 (VWR, Italia) attraverso

un tubo alla cui estremità era stato posto un ago. Ci si è assicurati il livello di vuoto desiderato mantenendo la pompa attiva per 5 minuti.

TRIZMA: I campioni destinati ad essere conservati dopo essere stati mantenuti ad un pH fisso di 7.4 grazie ad una soluzione tampone che imita i fluidi biologici, sono stati posti uno alla volta mediante l'uso di pinzette in contenitori in vetro. Le membrane sono state coperte con Trizma[®] base 0,1 M (Sigma-Aldrich[®]) e chiusi con tappo in gomma. Ogni contenitore è stato chiuso ermeticamente grazie all'applicazione di un colletto metallico con una ghiera.

Su ogni contenitore è stata posta un'etichetta che riportava data, tipo di trattamento effettuato, metodo di conservazione e data in cui effettuare la valutazione dell'angolo di contatto e il tempo di residenza.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

La causa principale di fallimento o riduzione dell'efficacia nel mantenimento dell'obiettivo pressorio post impianto di DDG risiede nella formazione di tessuto cicatriziale nel processo di rimarginazione tissutale o nell'incapsulamento fibrotico del dispositivo. I biomateriali di cui sono composti i DDG svolgono un ruolo attivo nell'immunomodulazione del sistema immunitario innato dell'occhio. Con una appropriata scelta del materiale si può mitigare o sfruttare l'interazione della superficie dell'impianto con i tessuti circostanti per ottenere la migliore aderenza agli obiettivi terapeutici prefissati. Se in passato molti materiali sono stati sviluppati con l'obiettivo di evitare di innescare il meccanismo di risposte a cascata che porta alla reazione da corpo estraneo, negli ultimi anni, si è cercato di interagire attivamente con il meccanismo di difesa naturale delle cellule immunitarie proponendo l'uso di materiali che modulino all'occorrenza una risposta pro o antinfiammatoria. I principali parametri su cui si basa la progettazione di impianti immunomodulanti per la gestione del glaucoma sono: chimica e topografia superficiale, porosità e resistenza meccanica [105]. Durante questo lavoro di tesi ci si è concentrati sulla modifica della chimica superficiale e sulla caratterizzazione di biomateriali che favoriscano l'integrazione del DDG guidando la risposta da corpo estraneo verso un processo di guarigione non disfunzionale dei tessuti coinvolti nell'impianto. Per valutare, adeguatamente e contemporaneamente, gli effetti dei parametri coinvolti nel processo di trattamento al plasma a bassa pressione con Ar ed O₂ (miscela di gas, tempo, potenza e pressione operativa) sull'incremento della bagnabilità superficiale e sulle modifiche delle caratteristiche chimico-fisiche e morfologiche delle membrane di PVDF e degli inserti di SILPURAN, ci si è serviti del DoE. In questo capitolo vengono presentati e discussi i risultati derivanti dall'ottimizzazione del trattamento al plasma e dalle caratterizzazioni descritte nella sezione MATERIALI E METODI.

4.1. Caratterizzazione morfologica delle membrane di PVDF

È stato dimostrato che scaffold con porosità simili a quelle della ECM nativa possano garantire la corretta comunicazione cellulare nei tessuti oculari ed indurre i macrofagi a mostrare fenotipo M2, in grado di promuovere una corretta guarigione dei tessuti attorno all'impianto secernendo citochine antinfiammatorie (IL10 e TGF- $\beta\beta$). I macrofagi in questo stato mostrano una morfologia oblunga ed estesa [105] quindi si è portati a pensare che membrane di fibre allineate siano un buon candidato per lo sviluppo o l'ottimizzazione di GDD in grado di promuovere una risposta antinfiammatoria nei tessuti ospitanti. A tale scopo, in questo lavoro si è scelto di utilizzare la tecnica dell'electrospinning per produrre matrici di fibre nanometriche allineate in polivinilidenefluoruro (PVDF). Il PVDF è un materiale biocompatibile e non degradabile che è stato già studiato nell'ambito del trattamento del glaucoma per valutarne l'azione antifibrotica[106]. Le formulazioni e i processi di preparazione dei substrati polimerici su cui effettuare i trattamenti al plasma erano stati già ottimizzati in precedenti lavori. Dopo la produzione, eseguita seguendo i protocolli descritti al paragrafo 3.1, sono state valutate le caratteristiche morfologiche e delle matrici al fine di avere dei dati con cui effettuare dei confronti post modifica superficiale. La morfologia, l'orientamento e il diametro medio delle fibre sono stati osservati mediante SEM. Come ci si aspettava tutte le membrane realizzate

hanno mostrato uno spiccato allineamento (figura 4.0). Il diametro medio calcolato su 250 fibre è $0.238 \pm 0.10 \mu\text{m}$. Osservando le bande dello spettro FTIR-ATR intorno a 763 , 1275 e 1234 cm^{-1} le membrane hanno mostrato possedere una fase elettroattiva (assegnata a β e γ) pari all' $89.13 \pm 3.2 \%$.

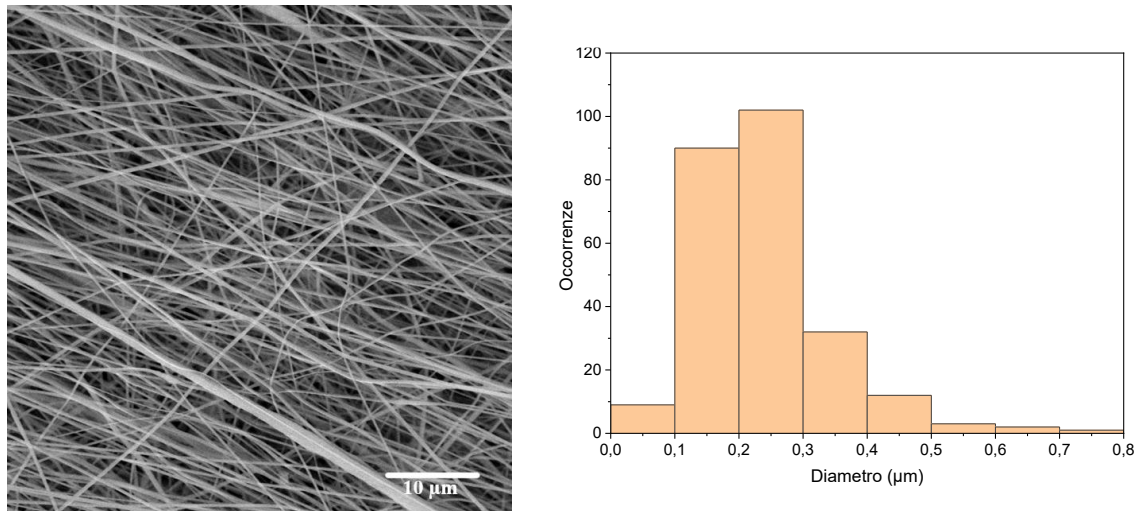


Figura 4.0: Immagine al SEM delle membrane di PVDF elettrofilate con fibre allineate non trattate con ingrandimento 5000x e scale bar $10 \mu\text{m}$ (a sinistra) e distribuzione dei diametri medi (a destra)

La misurazione dell'angolo di contatto ha permesso di verificare il comportamento idrofobico del PVDF (WCA di $116 \pm 4^\circ$, figura 4.1) e di avere il riferimento di partenza con cui valutare l'efficacia dei trattamenti al plasma.

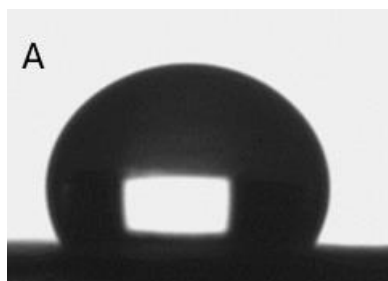


Figura 4.1: WCA del PVDF pre-trattamento

4.2 Trattamenti al plasma sulle membrane di PVDF

Molti dispositivi impiantabili falliscono nel loro scopo terapeutico a causa di reazioni avverse che avvengono all'interfaccia tra il materiale di cui sono costituiti ed i tessuti ospitanti. Per limitare questo problema negli ultimi anni sono stati sviluppati materiali biofunzionali in cui almeno una componente mira a modulare le reazioni che normalmente avverrebbero tra materiale e tessuto [6]. Le risposte infiammatorie ed immunitarie sono influenzate dalle proprietà fisico chimiche superficiali del biomateriale che, essendo modulabili in fase di progetto, offrono un'opportunità unica per evitare che il dispositivo una volta impiantato vada incontro ad incapsulamento fibrotico o ad una reazione da corpo estraneo. Le strategie più comunemente usate per ingegnerizzare il materiale sono le funzionalizzazioni superficiali

mediante metodi fisici o chimici [105]. Una delle tecniche di modifica superficiale più utilizzata è il trattamento al plasma poiché offre l'opportunità di ottenere, in un unico passaggio e senza l'uso di reagenti tossici, materiali con superficie con caratteristiche fisico-chimiche desiderate, mantenendo intatte le proprietà massive. In questo lavoro l'obiettivo è stato quello di indurre una riduzione del comportamento idrofobico e del WCA di materiali che potrebbero essere impiegati nella realizzazione di DDG. È stato dimostrato infatti che materiali con superfici che mostrano comportamento superficiale idrofilico siano più resistenti all'azione delle cellule immunitarie ed in grado di sopprimere la secrezione di citochine pro-infiammatorie che tenderebbero a scatenare il rigetto del dispositivo impiantato [105].

Prima di realizzare tutti gli esperimenti previsti (tabella 3.1) sono stati svolti dei trattamenti agli estremi degli intervalli selezionati per poter ottenere più informazioni sul sistema e determinare il corretto intervallo di variabilità [108]. In questa fase di screening si è notato che i trattamenti che prevedevano tempi prolungati di esposizione al plasma inducevano una contrazione delle dimensioni della membrana. Questi campioni, osservati al SEM, hanno mostrato un aspetto compatto con perdita della struttura allineata delle fibre come è visibile in figura 4.2. La superficie del polimero durante il trattamento al plasma è soggetta a riscaldamento, anche se il gas ha temperatura simile a quella ambiente, causato da reazioni esotermiche vicino alla superficie che stimolano il desorbimento delle molecole leggere e possono rendere inefficace la funzionalizzazione con i gruppi funzionali termicamente instabili.

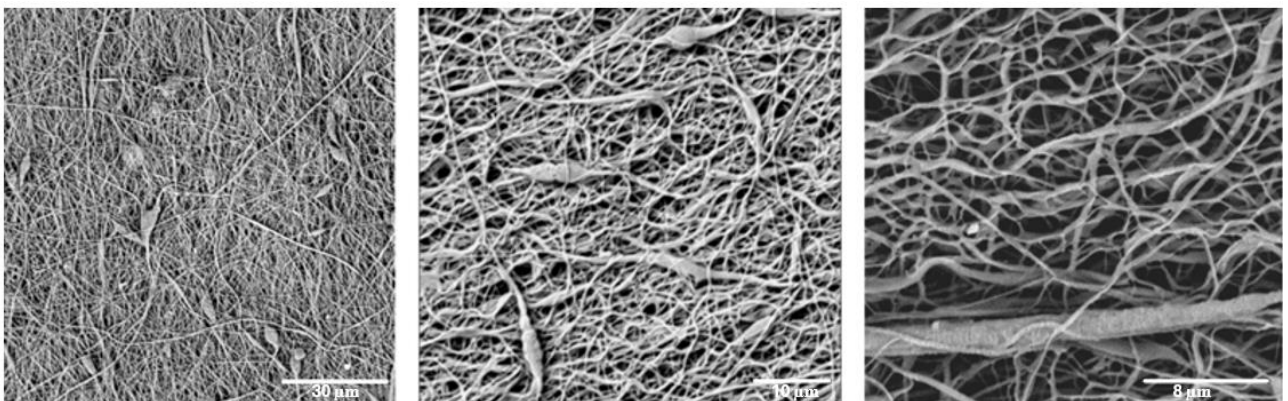


Figura 4.2: immagini al SEM a diversi ingrandimenti di membrane che hanno subito ritiro durante il trattamento al plasma con ingrandimento x2000, x5000, x10000 e scale bar di 30 μm, 10 μm e 8 μm

Si è quindi deciso di diminuire il tempo dei trattamenti fino ad un massimo di 180 secondi mantenendo l'estremo inferiore a 30 secondi e di scalare di conseguenza il tempo dei punti intermedi a 105 secondi. Ottenuta la matrice sperimentale randomizzata il flusso di lavoro preimpostato è servito a raccogliere i dati sperimentali utili (riassunti nella tabella 4.0) alla formulazione del primo modello. In alcuni esperimenti si è riscontrato l'assorbimento della goccia che ha reso impossibile misurare l'angolo di contatto superficiale. Per questo motivo, ogni volta che la goccia d'acqua è stata rapidamente assorbita dalla membrana (comportamento superidrofilo) e la superficie si è mostrata perfettamente bagnabile, il WCA è stato considerato pari a 0°.

Tabella 4.0: Matrice sperimentale con risposta misurata per ogni trattamento

Esperimento	Tempo [s]	Potenza [W]	Argon in miscela con O₂ [%]	Pressione [mbar]	WCA [°]
1	30	45	100	0.5	114.67
2	30	45	0	0.1	115.20
3	30	300	0	0.1	112.53
4	105	186	50	0.3	0.00
5	180	300	0	0.1	121.5
6	105	45	50	0.3	109.00
7	180	300	100	0.5	104.30
8	180	300	100	0.1	104.85
9	105	186	0	0.3	107.55
10	30	45	0	0.5	103.20
11	30	300	100	0.5	101.75
12	30	186	50	0.3	106.20
13	180	45	0	0.5	0.00
14	180	186	50	0.3	108.75
15	105	186	100	0.3	111.15
16	105	186	50	0.3	10.00
17	30	45	100	0.1	97.90
18	30	300	100	0.1	95.95
19	180	45	100	0.5	97.00
20	30	300	0	0.5	0.00
21	180	45	100	0.1	109.05
22	105	300	50	0.3	116.45
23	105	186	50	0.3	0.00
24	105	186	0	0.1	110.9
25	105	186	0	0.5	0.00
26	180	45	0	0.1	107.9
27	180	300	0	0.5	0.00

▪ **Stima del primo modello**

Prima di effettuare la stima dei coefficienti di regressione e di individuare l'equazione che descrive il modello bisogna analizzare la distribuzione e l'errore sperimentale. In figura 4.3 è possibile osservare i valori di R^2 ovvero la discrepanza tra punti sperimentali e i corrispondenti del modello, Q^2 che indica il valore predittivo del modello, Model Validity che confronta

l'errore sperimentale con quello del modello ed infine il valore di riproducibilità ovvero la quantificazione dell'errore sperimentale [108]. Il primo modello ha $R^2=0.277$, $Q^2=-0.004$, model validity= -0.045 e reproducibility= 0.985. Questi valori sono dovuti al fatto che i modelli utilizzati non sono in grado di rappresentare un processo che ha una risposta non graduale, come invece è quella del trattamento al plasma studiato.

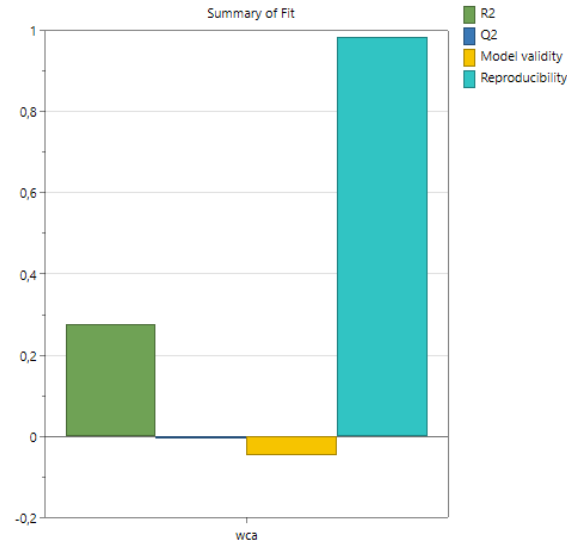


Figura 4.3: Diagramma dei parametri R2, Q2, MV, Rip

Per interpretare correttamente i dati derivanti dalla soluzione del modello bisogna conoscere l'area di confidenza degli input di processo reali al fine di ottenere un'elevata probabilità di massimizzazione del processo poiché le risposte adatte sono approssimazioni locali. Il processo di ottimizzazione è iterativo e permette di ottenere non solo i coefficienti e la forma dell'equazione adattata che meglio approssima la serie di esperimenti analizzata ma dà indicazioni su quali condizioni variare nella tornata sperimentale successiva [109]. Questo modello nonostante la scarsa predittività dona la possibilità di individuare più facilmente i parametri da ottimizzare osservando ad esempio la dipendenza della risposta dai fattori esaminati attraverso il diagramma dei coefficienti (figura 4.4) e le superfici di risposta.

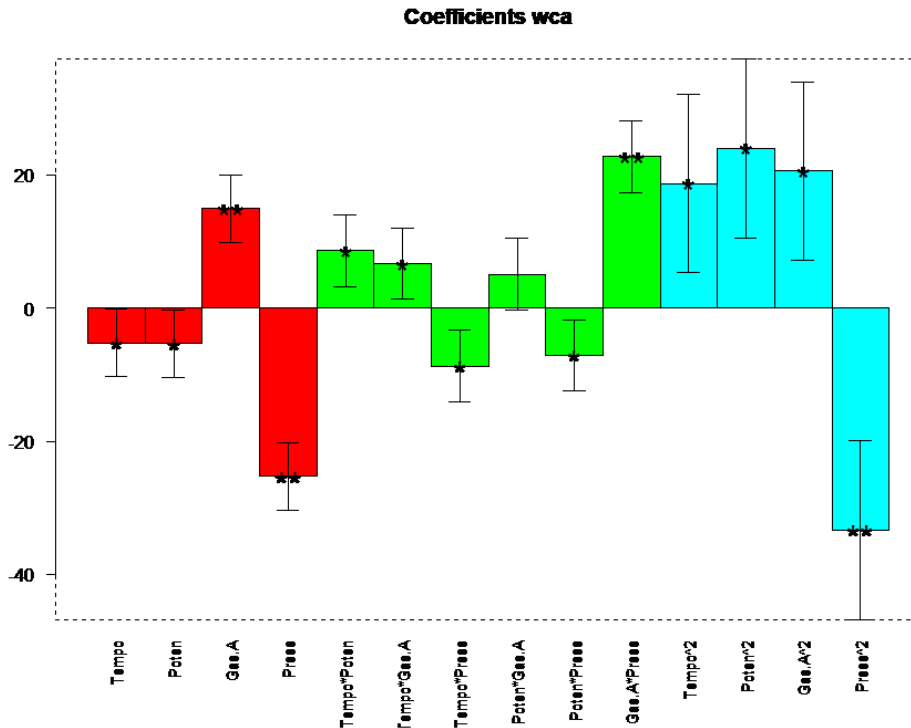


Figura 4.4: Diagramma dei coefficienti

Osservando il diagramma è possibile notare che tempo e potenza hanno coefficienti negativi. Volendo ottenere un decremento del WCA è preferibile lavorare a potenze elevate per un tempo prolungato ma trattando le membrane con condizioni operative estreme queste vanno in contro a ritiro. Per evitare il danneggiamento delle fibre è stato scelto di ridurre il range della potenza per le ottimizzazioni successive. Il coefficiente che tiene conto della percentuale di Argon in miscela con l'O₂ è positivo in accordo con quanto riportato in letteratura dove attraverso il trattamento al plasma con O₂ si ottengono membrane superidrofiliiche mentre la riduzione di WCA è meno marcata se la modifica superficiale è operata con miscele Ar/O₂ o Ar puro [110]. Il modello suggerisce che con percentuali maggiori di ossigeno in miscela è potenzialmente più semplice ottenere WCA inferiori rispetto a quando si ha una preponderanza di Argon. La pressione ha coefficiente negativo quindi si può pensare che per ottenere la modifica superficiale di nostro interesse sia bene lavorare a pressioni elevate. L'osservazione delle superfici di risposta (figura 4.5) conferma che il modello non è adeguato a rappresentare il processo, mostrando una variazione graduale dell'angolo di contatto e addirittura predicendo valori più alti di WCA.

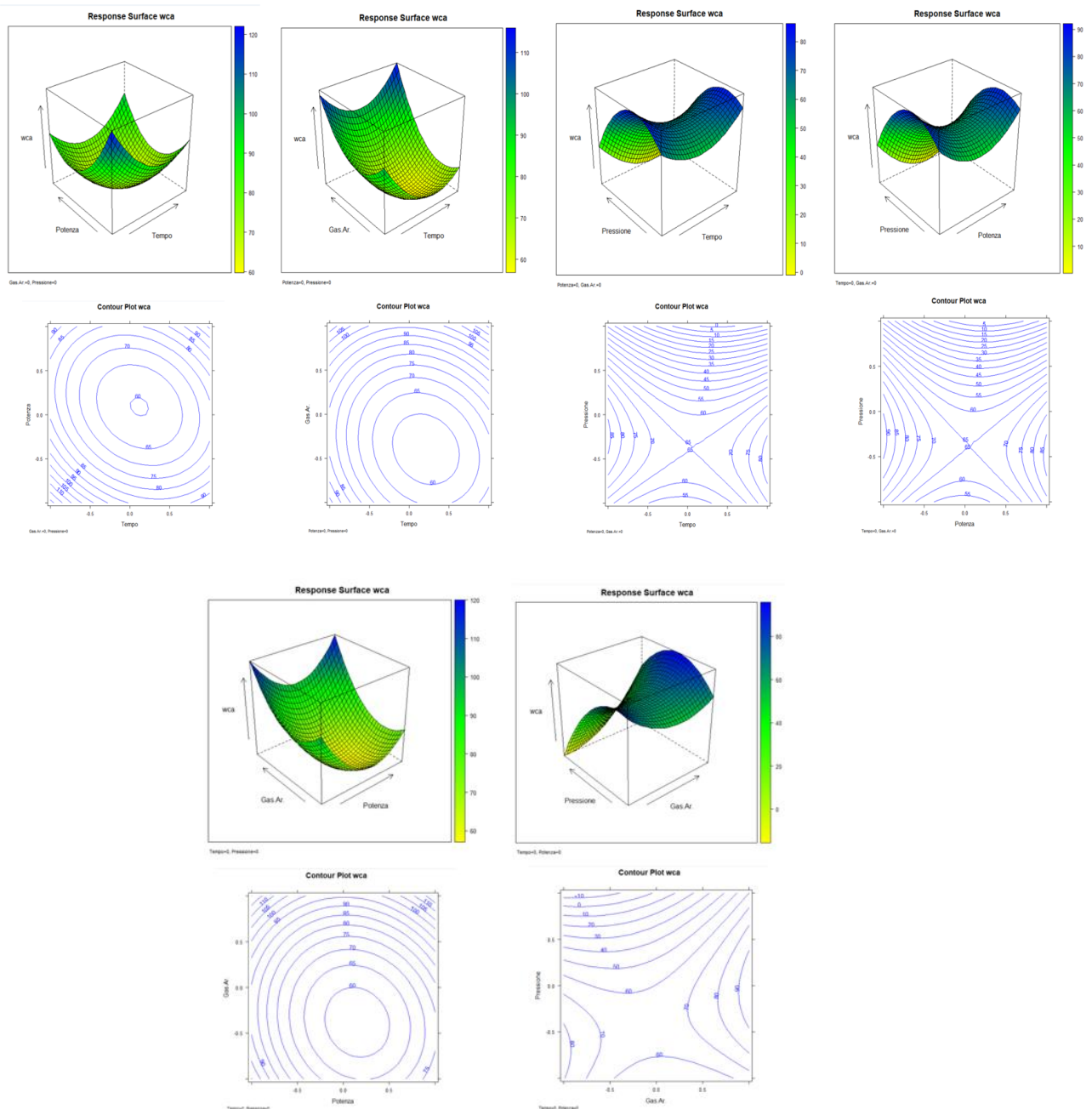


Figure 4.5: Superfici di risposta

A seguito di un'analisi qualitativa è stato scelto di mantenere fissi a 0.5 mbar e 100% O₂ i valori di pressione e gas di trattamento per tutte le ottimizzazioni successive, visto che risultano le condizioni ottimali per migliorare la bagnabilità delle membrane di PVDF.

- **Valutazione della stabilità della modifica superficiale**

Una volta ottenute dal modello le indicazioni di massima sul migliore trattamento al plasma per raggiungere la minimizzazione dell'angolo di contatto è stata valutata la stabilità nel tempo dei trattamenti che garantivano un comportamento superidrofiliico. L'obiettivo di questo lavoro,

infatti, non era solo quello di trovare un trattamento efficace nel breve termine ma quello di indurre una modifica superficiale permanente sulle membrane di PVDF. A tale scopo sono stati misurati per 10 giorni consecutivi gli angoli di contatto delle membrane trattate con i seguenti trattamenti:

- Esperimento 4:105 secondi, 186 W di potenza, 50% O₂ e 50% Ar e 0.3 mbar di pressione;
- Esperimento 13:180 secondi, 45 W di potenza, 100% O₂, 0.5 mbar di pressione;
- Esperimento 16:105 secondi, 186W di potenza, 50% O₂ e 50% Ar, 0.3 mbar di pressione;
- Esperimento 20: 30 secondi, 300 W di potenza e,100% ossigeno e 0.5 mbar di pressione;
- Esperimento 23: 105 secondi, 186W di potenza, 50% O₂ e 50% Ar,0.3 mbar di pressione;
- Esperimento 25:105 secondi, 186 W di potenza, 100%ossigeno e 0.5 mbar di pressione;
- Esperimento 27:180 secondi, 300 W potenza, 100% Ossigeno e 0.5 mbar di pressione.

Le membrane trattate con il trattamento 4, 13 hanno mostrato un lento e progressivo recupero idrofobico nell'intervallo di osservazione, mentre i trattamenti 16, 23 (repliche del punto al centro del modello del DoE) hanno mostrato scarsa riproducibilità della misura della risposta, per questo motivo non sono stati ulteriormente approfonditi e scartati per i successivi step di ottimizzazione.

▪ **Valutazione delle caratteristiche morfologiche delle membrane trattate al plasma**

Le caratteristiche morfologiche delle membrane trattate al plasma sono state valutate attraverso analisi SEM, selezionando, tra i 27 trattamenti effettuati quelli che garantivano una diminuzione del WCA stabile anche dopo 10 giorni. Per valutare invece l'effetto dell'Ar sulle fibre sono stati osservati due campioni trattati come di seguito specificato:

- Esperimento 7: 180 secondi, 300 W di potenza, 100% Ar e 0.5 mbar di pressione;
- Esperimento 8: 180 secondi, 300 W di potenza, 100% Ar e 0.1 mbar di pressione.

Nella figura 4.6 è possibile osservare le membrane di PVDF trattate con il trattamento 4,7,8,20,25,27. Tutte le membrane trattate con Ar non subiscono alcuna modifica morfologica e mantengono l'allineamento tipico delle fibre elettrospinnante sul collettore rotante. I campioni trattati con O₂ e 300 W subiscono invece dei danni molto probabilmente indotti dal raggiungimento in camera di temperature elevate che ne modificano la morfologia. Le membrane infatti appaiono compatte e non si riescono più a distinguere le fibre che tipicamente costituiscono una matrice porosa. Da qui la scelta di valutare solo trattamenti con una potenza massima di 186 W nello stilare le successive matrici sperimentali.

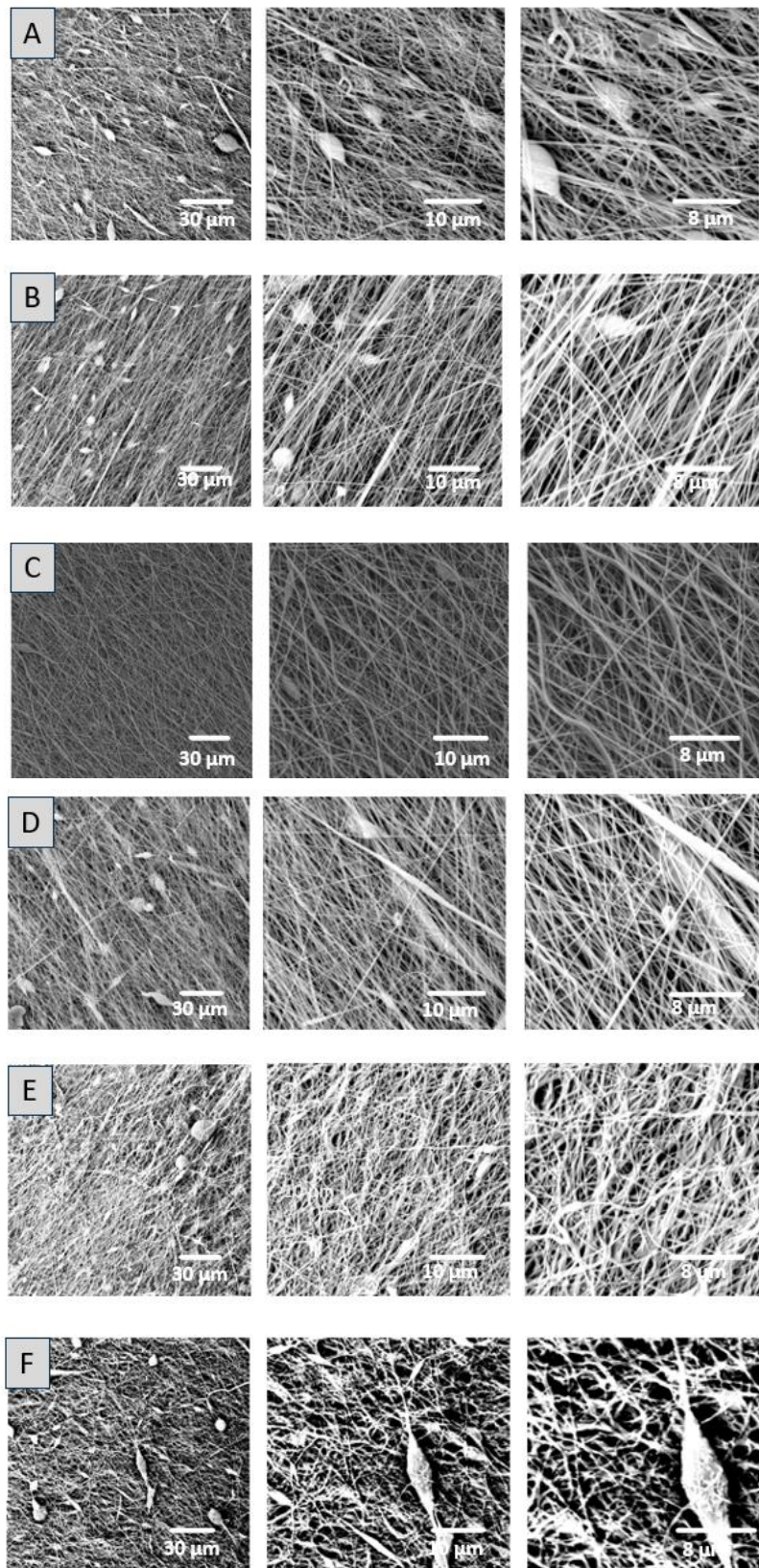


Figura 4.6: Immagini SEM delle membrane sottoposte a trattamento 4(A), 7(D), 8 (B), 20 (E), 25(C) e 27 (F) con ingrandimento x2000, x5000, x10000 e scale bar di 30 μm, 10 μm e 8 μm

▪ Effetto del plasma sulla fase cristallina del PVDF

Uno dei metodi più utilizzati per valutare come i parametri di lavorazione, i trattamenti meccanici, termici, elettrici e chimici, influenzano le proprietà elettroattive del PVDF è l'analisi FTIR [70]. Osservando lo spettro IR delle membrane (figura 4.7) e l'intensità dei picchi a determinati numeri d'onda è infatti possibile valutare quanti e quali fasi presenta il campione in esame, utilizzando le equazioni 3.3, 3.4 e 3.5 mostrate nel capitolo 3.

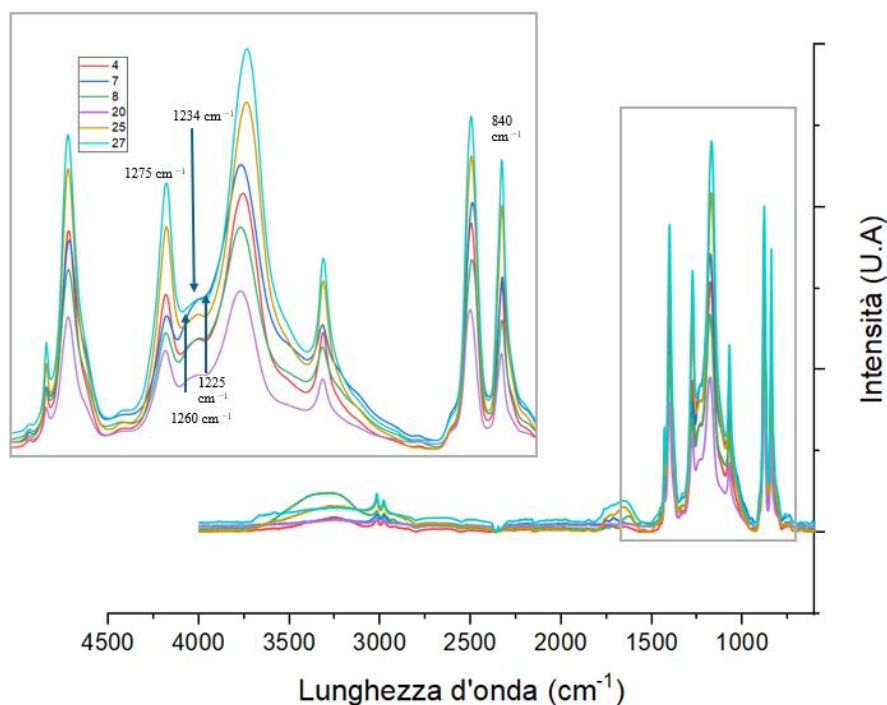


Figura 4.7: spettri FTIR dei campioni non trattati e di quelli sottoposti ai trattamenti 4,7,8,20,25,27

La figura 4.8 mostra la percentuale di fase α , β e γ dei campioni non trattati, e di quelli sottoposti ai trattamenti 4,7,8,20,25,27 con i rispettivi spettri FTIR-ATR da cui sono state effettuate le quantificazioni. In tutti i campioni analizzati la fase β è preponderante rispetto alle fasi α e γ in accordo con quanto affermato in letteratura. Il PVDF, infatti, durante il processo di filatura è sottoposto a tensioni elevate e all'evaporazione veloce dell'acetone in soluzione, che favoriscono l'allineamento dei dipoli elettrici e la trasformazione della fase α in β [111]. Se in tutti gli spettri è ben visibile il picco a 840 cm^{-1} utile per identificare la fase elettroattiva ($\beta+\gamma$) quello attorno a 1234 cm^{-1} assume spesso l'aspetto di una spalla, di conseguenza la differenza di assorbanza con la valle più vicina intorno a 1225 cm^{-1} o è ridotta o non è quantificabile quindi si assume l'assenza di fase γ nel campione. Non si evidenzia la diminuzione della fase piezoelettrica durante i trattamenti al plasma con potenza elevata (7,8,20,27), contrariamente a quanto riportato in letteratura [112]. Essendo un processo ottimizzato, la potenza risulta insufficiente per indurre una modifica della struttura cristallina.

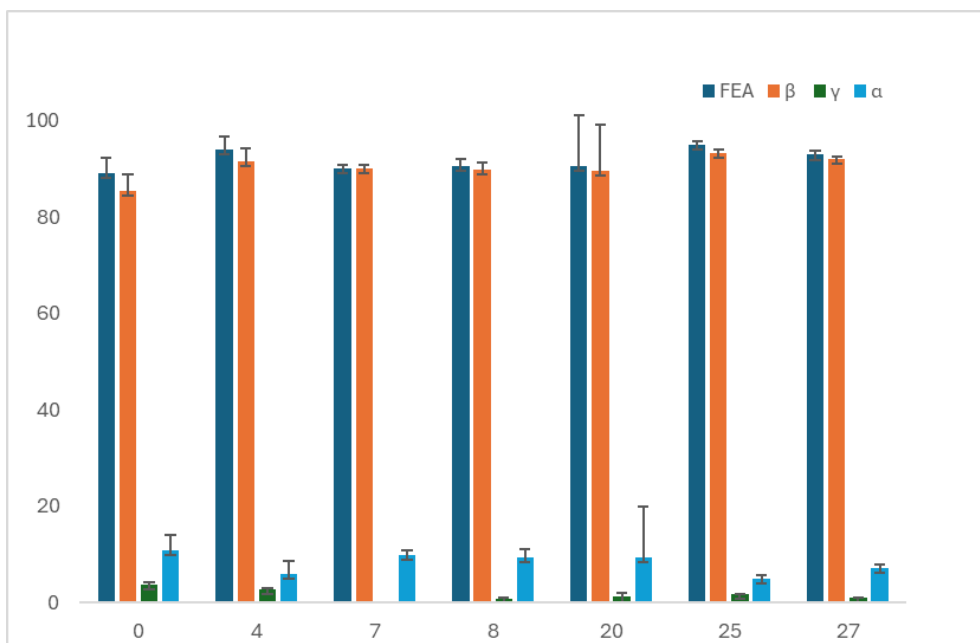


Figura 4.8: Percentuale di fase α , β e γ dei campioni non trattati e di quelli sottoposti ai trattamenti 4,7,8,20,25,2

▪ **Valutazione della stabilità della modifica superficiale**

Dopo tutte queste caratterizzazioni è stato selezionato un trattamento che garantisca una buona ripetibilità del processo, percentuale di fase β elevata, non danneggiamento delle fibre e comportamento idrofilico per almeno 10 giorni su cui valutare la stabilità della modifica superficiale indotta dal plasma a 28 giorni. I campioni sono stati mantenuti in aria, vuoto e TRIZMA 0,1 M (campione a PH 7,4) per testare dei possibili metodi di conservazione da utilizzare nel caso in cui il trattamento venisse valutato come processo scalabile. La scelta è ricaduta sul trattamento dell'esperimento 25. I campioni dopo 28 giorni sono stati sottoposti alla misura dell'angolo di contatto e durante ogni misurazione è stato registrato un video per valutare il tempo di residenza della goccia prima di penetrare nella membrana superidrofiliica. Tutti i campioni trattati 105 secondi, 186 W di potenza, 100% O₂ e 0.5 mbar di pressione sono rimasti superidrofiliici (WCA=0°) in tutte e tre le condizioni di conservazione mentre il tempo di residenza ha mostrato un'elevata variabilità (Tabella 4.1). I controlli, membrane non trattate conservate nelle medesime condizioni, hanno sempre mostrato comportamento idrofobico.

Tabella 4.1: tempo di residenza sui campioni dell'ESP 25 dopo 28 gg

ARIA	0.31±0.03s
TRIZMA	0.35±0.02s
VUOTO	0.27±0.01s

▪ **Misure XPS: valutazione della chimica superficiale**

Le misure XPS sono state effettuate sulla membrana trattata 105 secondi, 186 W di potenza, 100% O₂ e 0.5 mbar di pressione e sul controllo (PVDF non trattato) per verificare la modifica della chimica superficiale avvenuta in seguito all'attivazione operata dal plasma. Carbonio e fluoro sono stati rilevati in entrambi i campioni (figura 4.9-(A) e (B)) mentre l'ossigeno solo in quello sottoposto al plasma. Questo indica che nella membrana tal quale non sono presenti contaminazioni derivanti dall'esposizione in aria dopo la fabbricazione né residui dei solventi utilizzati per produrre le fibre.

▪ **Composizione campioni**

Le membrane PVDF non modificate superficialmente sono composte al 56.09% da C e al 43.91% da F mentre quelle trattate hanno la seguente composizione: 54.14% C, 40.20% F e 5.67% O. Il C subisce una diminuzione pari all'1.95 % mentre il F del 3.71%. Il rapporto Fluoro/Carbonio (F/C) passa da 0.78 nel campione di controllo a 0.74 nelle membrane trattate al plasma. Il rapporto Ossigeno/Carbonio (O/C), valutabile solo sulle fibre trattate, raggiunge un valore di 0.10. Questi dati evidenziano che il trattamento è stato efficace nell'attivare la superficie del PVDF su cui è avvenuta una defluorurazione e una conseguente ossidazione che ha portato le fibre ad incorporare ossigeno e a mostrare un comportamento idrofilico. Un aumento complessivo dell'idrofilia della membrana è spesso spiegato in letteratura come il risultato dalla formazione di gruppi idrofili C=O, OH e COOH sulla superficie a seguito della scissione dei gruppi idrofobi, operata dagli elettroni altamente energetici presenti nel plasma che porta ad una riduzione di fluoro e alla sua sostituzione con gruppi ricchi di ossigeno [112], [113].

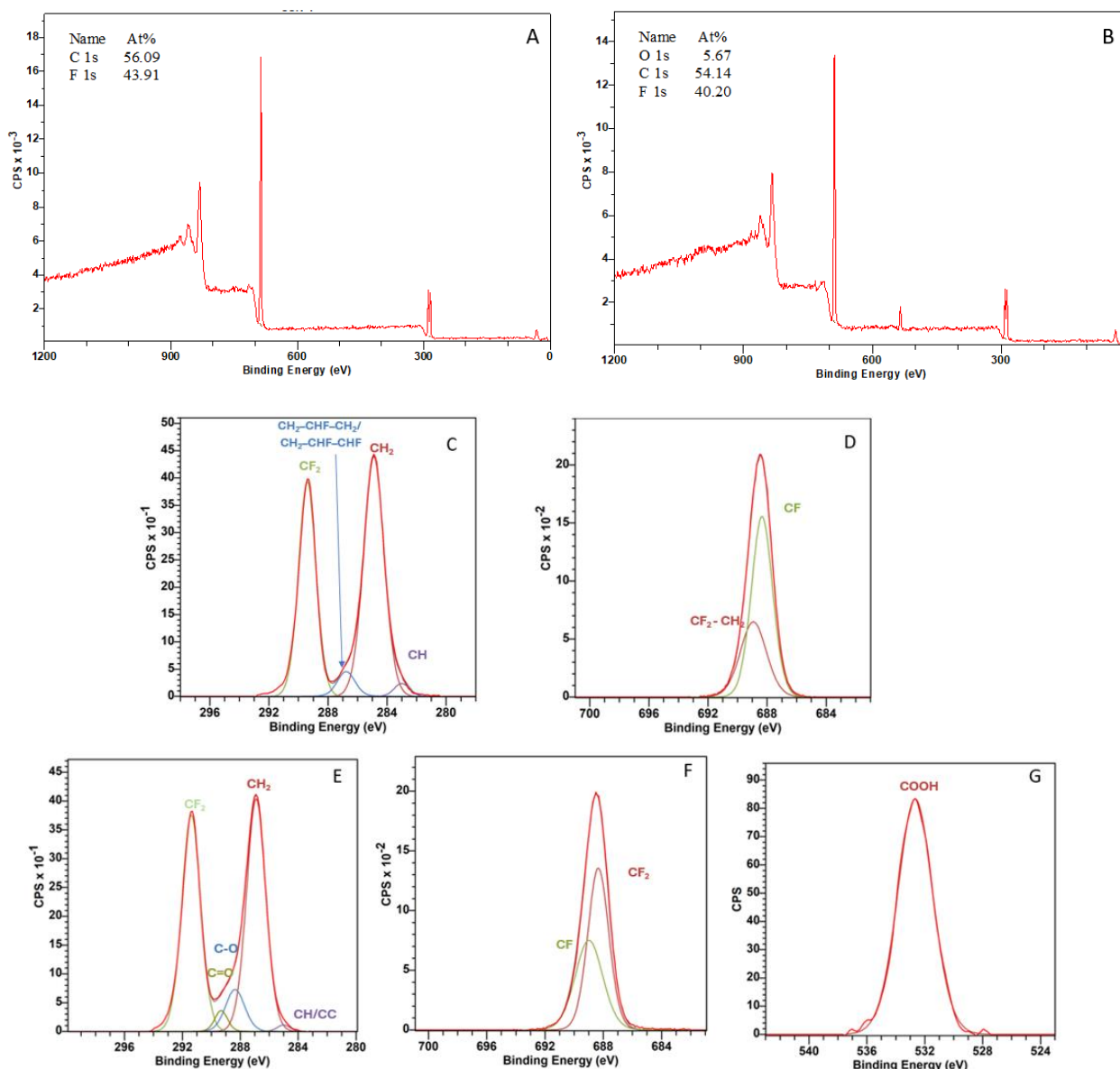


Figure 4.9: Scansione Survey delle membrane di PVDF non trattate (A) e sottoposte al trattamento al plasma 25 (B) e Deconvoluzione dei picchi C1s (C) e F1s (D) del PVDF non trattato e dei picchi C1s (E), F1s (F) e O1s (G) delle membrane sottoposte al trattamento 25

È stata effettuata la deconvoluzione (figura 4.9 – (C),(D),(E),(F),(G)) dei picchi C1s, F1s e O1s per verificare la presenza di vari gruppi funzionali. Le fibre di PVDF non trattate mostrano picchi C1s a: 284.6 eV, 286.4 eV, 288.2 eV, 290.9 eV rispettivamente assegnati al legame CH, CH₂, CH₂-CHF-CH₂ / CH₂-CHF-CHF, CF₂ e picchi F1s a: 688.3 eV e 688.98 eV assegnati rispettivamente a CF e CF₂-CH₂. Le fibre trattate al plasma mostrano invece picchi C1s a: 285 eV, 286.9 eV, 288.39 eV, 298.37 eV, 291.38 eV, assegnati rispettivamente ai gruppi CH/C-C, CH₂, C-O, C=O, e CF₂. Il picco O1s a: 534.5 eV assegnato al gruppo COOH, ed infine F1s mostra picchi a: 688.2 eV e 688.9 eV assegnati rispettivamente ai gruppi, CF₂ e CF.

▪ **Ottimizzazione per il mantenimento delle proprietà meccaniche**

Nonostante tutti i risultati dei test effettuati, fino a quel momento, sulle membrane trattate con l'ESP 25 (105 secondi, 186 W di potenza, 100% O₂ e 0.5 mbar) fossero soddisfacenti, quando si è provato a separare le membrane dal supporto in alluminio su cui erano state si è notato che non si riusciva a maneggiarle senza danneggiarle o distruggerle. Questo problema di infragilimento è stato oggetto di ulteriori studi per migliorare le proprietà meccaniche delle membrane trattate. Partendo dai trattamenti della matrice sperimentale che garantivano un buon incremento dell'idrofilicità si è proceduto a ridurre i range entro cui far variare tempo e potenza del trattamento mantenendo il 100% di Ossigeno e 0,5 mbar di pressione per tutti i trattamenti. Sono state stilate otto diverse matrici sperimentali utilizzando il disegno fattoriale completo per riuscire ad ottenere dei valori di tempo e pressione che garantissero comportamento superidrofilico delle membrane di PVDF, morfologia non alterata delle fibre trattate, buona maneggiabilità delle membrane, ripetibilità e stabilità delle modifiche chimico-fisiche. Da ogni set di esperimenti realizzato è stato selezionato il trattamento migliore, in termini di riduzione dell'angolo di contatto e maneggiabilità delle membrane, una volta separate dal supporto in alluminio, da utilizzare come valore "+1" nella matrice sperimentale successiva al fine di ottenere i parametri minimi di tempo e potenza che garantissero tutte le specifiche sopraindicate. Sottoponendo i campioni ai trattamenti della prima matrice sperimentale che garantivano WCA=0° (per valutarne la ripetibilità) e usando come range di trattamento: 30 ÷ 105 s e 45 ÷ 186 W per impostare una nuova campagna di esperimenti è stato selezionato, in prima battuta, il trattamento 90s, 186W poiché garantiva superfici superidrofiliche e buona ripetibilità. La maneggiabilità delle membrane sottoposte a questo trattamento però non era sempre garantita quindi è stato impostato un nuovo piano sperimentale con tempo di trattamento variabile tra 40 ÷ 90 s e potenza tra 105 ÷ 186 W al fine di trovare una buona combinazione tra i due parametri. Il trattamento 40 s e 105 W, i cui campioni osservati al SEM non hanno mostrato alcun danno a carico delle fibre, erano perfettamente maneggiabili anche senza supporto in alluminio e idrofilici. I test effettuati hanno però evidenziato un problema di ripetibilità in dipendenza dello spessore delle membrane e random ed un lento ma progressivo recupero idrofobico nei 7 gironi successivi al trattamento. Valutando questi risultati la terza tornata di test è stata effettuata con tempi che variavano da 45 ÷ 60 s mantenendo fissa la potenza a 90 W. Anche in questo caso nessun trattamento risultava essere ripetibile e/o mostrare una modifica stabile a 7 giorni. Per verificare l'effetto di trattamenti eseguiti per tempi prolungati mantenendo bassa la potenza, la quarta matrice è stata realizzata impostando i seguenti parametri: 300 ÷ 420 s e 60 ÷ 90 W. In questo caso non si è presentato nessun problema di ripetibilità ma le membrane risultavano estremamente fragili e non maneggiabili. Per i test successivi, preso atto che tempi di trattamento prolungati avessero un effetto negativo sulle fibre di PVDF, si è impostato un piano sperimentale i cui estremi di variabilità del tempo sono stati fissati tra 180 ÷ 300 s e quelli della potenza tra 60 ÷ 90 W. La combinazione tempo-potenza minima che garantiva una modifica efficace ai nostri scopi, in questo caso, era 180s e 60 W. Procedendo a minimizzare ulteriormente entrambi i parametri, per ridurre al minimo il rischio di danneggiare le matrici, sono stati valutati trattamenti con parametri compresi tra 150 ÷ 180s e 45 ÷ 60 W. Da qui è stato preso in esame il trattamento al plasma con tempo pari a 150 s e potenza di 45 W; infatti, l'ulteriore minimizzazione prevedeva di valutare l'angolo di contatto su membrane sottoposte a trattamenti al plasma con combinazione tempo-potenza, rispettivamente, di 90 ÷ 150 s e 36 ÷

45W. Da questi esperimenti si è potuto appurare che con potenze pari a 36 W e tempi pari o inferiori 120s la superficie delle membrane mostra comportamento idrofobico. La combinazione di trattamento 130 s e 45W è stata selezionata come il miglior compromesso nel garantire non fragilità, buona maneggiabilità e superidrofilicità. I test dell'angolo di contatto a 7 giorni hanno mostrato però poca stabilità della modifica e un recupero idrofobico in molti campioni. Tutti i dati raccolti durante le ottimizzazioni hanno portato alla selezione del trattamento in tabella 4.2:

Tabella 4.2: trattamento ottimizzato

Tempo [s]	Potenza [W]	Gas	Pressione [mbar]
150	45	O ₂	0.5

come il migliore in grado di produrre una modica superficiale ripetibile, riproducibile che induce un comportamento superidrofilico senza danneggiare le fibre delle membrane come è possibile vedere in figura 4.10 e quindi permettendo una buona maneggiabilità delle stesse. Le prime fasi del processo di ottimizzazione sono riassunte in tabella 4.3.

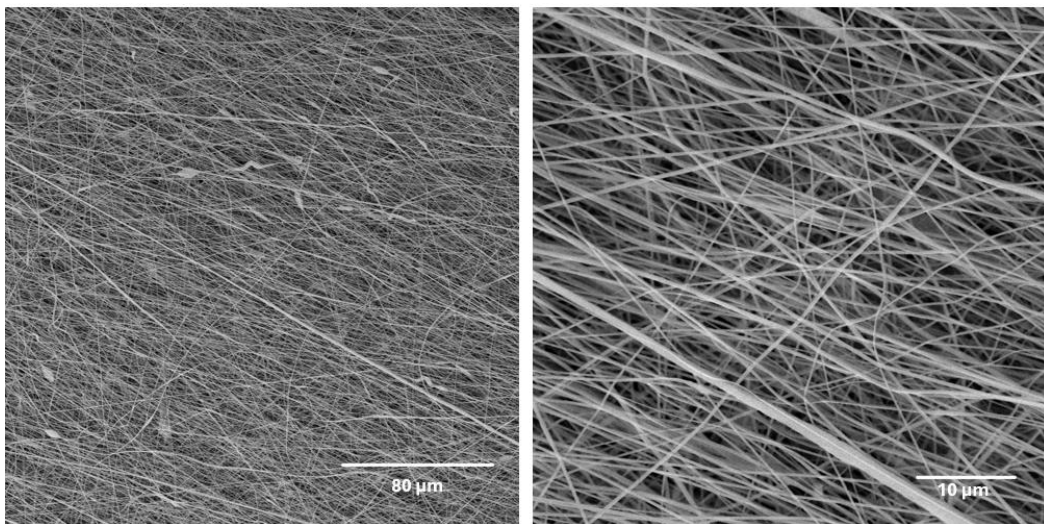


Figura 4.10: immagine SEM membrane trattate 150s,45W,O₂ e 0.5 mbar

Tabella 4.3: Ottimizzazione per il mantenimento delle proprietà meccaniche

Problema	Parametri ottimizzati	Tempo (s)	Potenza (W)
infragilimento membrane	t ↓ e P ↓ partendo dai trattamenti che garantivano WCA=0°	30 ÷ 105	45 ÷ 186
scarsa maneggiabilità	t ↓ e P ↓	40 ÷ 90	105 ÷ 186
bassa ripetibilità	t ↑ e P ↓	45 ÷ 60	90
infragilimento membrane	t ↓ e P ↓	300 ÷ 420	60 ÷ 90
scarsa ripetibilità e maneggiabilità	t ↓ e P ↓	180 ÷ 300	45 ÷ 60
scarsa ripetibilità e maneggiabilità	t ↓ e P ↓	150 ÷ 180	45 ÷ 36

▪ **Test di stabilità**

Si è scelto, anche in questo caso, di valutare la stabilità della modifica superficiale indotta dal trattamento al plasma dopo 28 giorni conservando le matrici trattate 150 secondi, 45W di potenza, 100% O₂ e 0.5 mbar di pressione in tre diversi mezzi di conservazione (ARIA, VUOTO E TRIZMA 0.1 M). Tutti i campioni trattati sono rimasti superidrofilici (WCA=0°) in tutte e tre le condizioni. Il tempo di residenza, misurato allo scadere dei 28 giorni, pur mostrando un'elevata variabilità (Tabella 4.4) ha evidenziato la soluzione buffer come mezzo di conservazione migliore poiché garantisce un tempo di residenza inferiore della goccia sessile rispetto a quello valutato sulle membrane subito dopo il trattamento (0.85±0.07s). Questo potrebbe essere dovuto alla reazione della superficie attivata dal plasma con i gruppi idrofili del NH₂C(CH₂OH)₃. Le membrane non trattate conservate nelle medesime condizioni, hanno mostrato comportamento idrofobico.

Tabella 4.4: tempo di residenza sui campioni dell'esperimento 150s,45 W, O₂ e 0.5 mbar dopo 28 gg

ARIA	1.02±0.05s
TRIZMA	0.82±0.06s
VUOTO	1.73±0.18s

▪ **Ottimizzazione per scale up**

Per valutare la scalabilità del processo si è deciso di testare campioni di grandi dimensioni (ca 5x20 cm). Si è visto che la modifica superficiale non era efficace a produrre un abbassamento dell'angolo di contatto uniforme su tutta l'area investita dal gas-plasma. Fino a quel momento erano stati trattati 3 campioni quadrati di lato circa 1 cm alla volta e i risultati non avevano mai mostrato nessuna discrepanza. Si è proceduto quindi a verificare l'influenza della posizione del campione all'interno della camera sul risultato del trattamento. Sono stati trattati 6 campioni (1

cm*1cm) per ogni zona selezionata del vassoio portacampioni (4 in totale, come mostrato in figura 4.11).

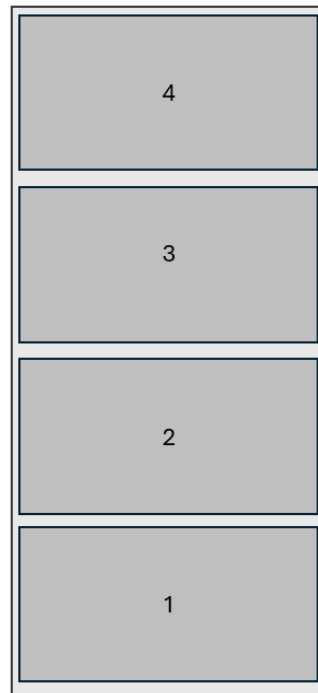


Figura 4.11: portacampioni diviso in 4 aree per verificare l'influenza della posizione del campione all'interno della camera sul risultato del trattamento. L'area 1 è quella vicina all'ingresso, mentre l'area 4 è quella vicina al fondo della camera.

Tutti i 24 campioni trattati 150s, a 45 W, con O₂ e a 0.5 mbar mostravano comportamento superidrofílico. Lo stesso test è stato effettuato con membrane random e spesse ottenendo i medesimi risultati. Questi dati hanno reso possibile escludere l'influenza della posizione in camera dei campioni sul risultato del trattamento stesso. Si è proceduto quindi a valutare i flussi di O₂ immessi in camera durante il trattamento al plasma per mantenere la pressione impostata. Si è potuto notare che trattando i campioni di piccole dimensioni si avevano flussi di circa 190 sccm che invece scendevano fino a 150 sccm quando in camera erano poste membrane di grandi dimensioni. Si è pensato quindi di impostare un programma di trattamento al plasma, in controllo di flusso mantenendo inalterate le altre variabili, compresa la pressione in camera durante il processo (0.5 mbar). Questo perché un minore apporto di ossigeno può ridurre le specie reattive in grado di legarsi ai gruppi idrofíli ed in grado di render più bagnabile la superficie. I trattamenti 150 s, 45 W, 190 sccm, 0.5 mbar e O₂ hanno mostrato un netto miglioramento della bagnabilità sui campioni di grandi dimensioni ma era ancora riscontrabile il problema della disomogeneità della riduzione dell'angolo di contatto sulle membrane trattate. Per ottenere omogeneità della bagnabilità sull'intera superficie sono stati valutati trattamenti con tempi fino a 210 s mantenendo fissi flusso pari a 190 sccm, O₂ e 45 W di potenza. Il tempo è stato variato di 30 secondi alla volta. Il trattamento migliore finale è risultato essere il seguente: 180s, 45W, O₂ , 190 sccm (0.5 mbar). Questo trattamento, infatti, è funzionale nell'indurre una modifica superficiale efficace su campioni di ogni dimensione (compatibilmente con la camera dello strumento utilizzato), garantisce elevata bagnabilità delle membrane che mostrano comportamento superidrofílico che si mantiene nel tempo, è inoltre

riproducibile, ripetibile, non induce danni visibili alle membrane e garantisce buona maneggiabilità.

Il processo che ha portato ad ottenere il trattamento migliore per trattare le membrane di PVDF è riassunto nella tabella 4.5 che segue.

Tabella 4.5: Schema dell'ottimizzazione per scale up

Problema	Parametri ottimizzati	Tempo (s)	Potenza (W)
trattamento inefficace su campioni grandi	$t \uparrow$ e P cost	150÷90	45
trovato trattamento ottimo	Controllo flusso	150÷180	45

4.4 Caratterizzazione morfologica e chimico-fisica delle membrane sottoposte ai trattamenti ottimizzati

Le membrane trattate con l'esp 2_30 (150 s, 45 W, O₂, 0.5 mbar) e l'esp 3_0 (180s, 45W, O₂, 190 sccm) sono state osservate al SEM per verificare eventuali cambiamenti morfologici avvenuti a seguito dell'interazione delle fibre di PVDF con il plasma. Dalle immagini (figura 4.12) non si apprezzano particolari differenze rispetto ai campioni di membrana non trattata, le fibre rimangono allineate e non vi sono segni di etching superficiale. Per verificare che le fibre non subiscano danni a seguito dei trattamenti sono stati misurati i diametri medi. L'andamento riportato in figura 4.4-1 mostra che non vi sono variazioni significative tra i diametri medi del campione non trattato e quelli sottoposti al trattamento 2_30 e 3_0 si può dedurre quindi che entrambi i trattamenti non provocano variazioni delle proprietà morfologiche, pur modificando la superficie, dei campioni [112]. I diametri medi con le relative deviazioni standard dei campioni sottoposti ai trattamenti che, nel processo di ottimizzazione, sono risultati papabili candidati ad indurre una modifica superficiale tale da rendere le membrane di PVDF un potenziale materiale per la produzione di DDG sono riportati in Tabella 4.6. Come è possibile notare solo il trattamento 25 riporta fibre con diametro medio inferiore rispetto a quelle del campione non trattato, questo dato potrebbe giustificare l'impossibilità di maneggiare facilmente le membrane post trattamento. La resistenza meccanica è infatti correlata al diametro delle fibre, minore è il diametro, minore sarà la sezione resistente e quindi la resistenza meccanica [114]. Altro motivo potrebbe essere imputabile all'aumento della temperatura superficiale indotta dall'elevata potenza di trattamento sulle fibre di PVDF, temperature oltre i 70 °C inducono dei moti segmentali cooperativi tra fasi cristalline e ne influenzano inevitabilmente le proprietà meccaniche [112], [115].

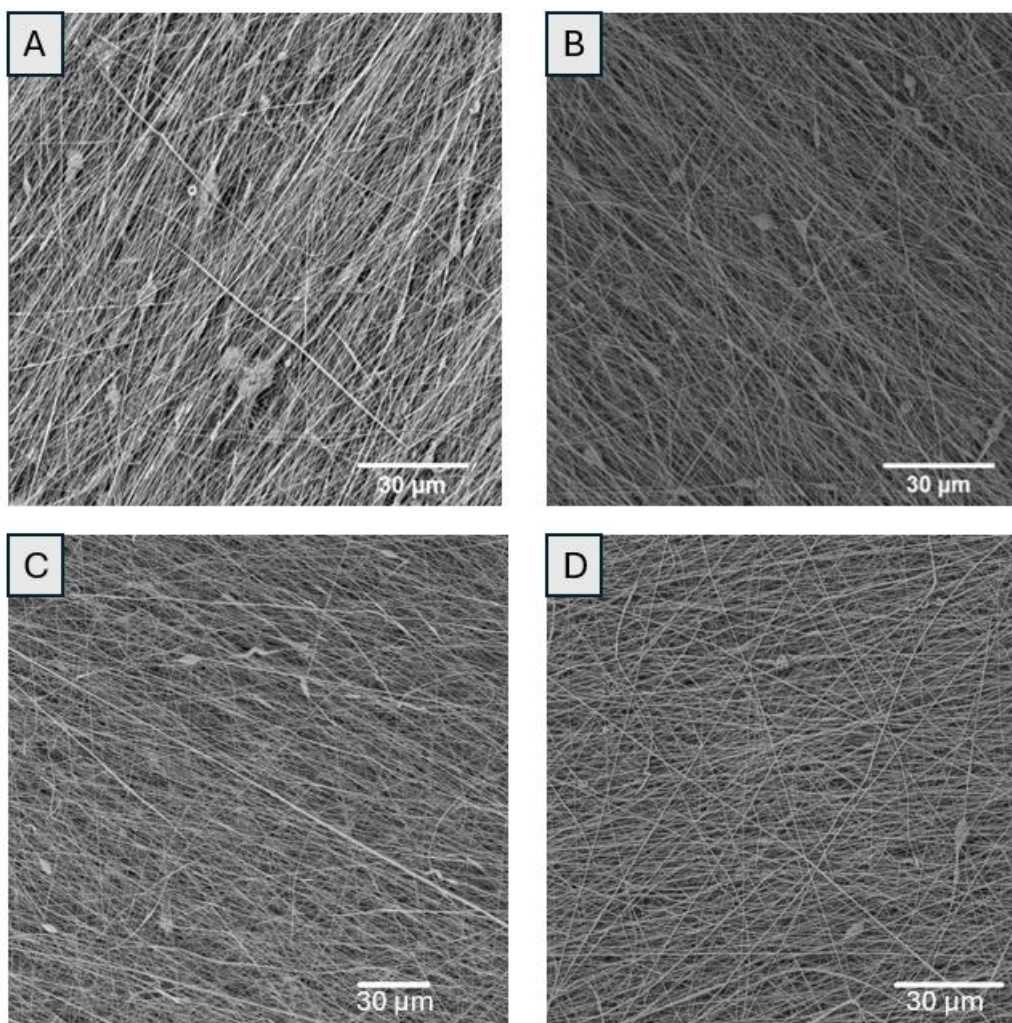


Figura 4.12: Immagini Sem delle membrane non trattate (A), trattate con esp 25 (B), esp 2_30 (C) e 3_0 (D), scale bar 30 μm

Tabella 4.6: diametri medi delle membrane trattate con esperimento 25, 2_30, 3_00

Esperimento	Trattamento al plasma	Diametro medio [μm]
0	Non trattato	0.238 ± 0.104
25	105 s, 186 W, O ₂ , 0.5 mbar	0.213 ± 0.018
2_30	150 s, 45 W, O ₂ , 0.5 mbar	0.231 ± 0.065
3_0	180s, 45W, O ₂ , 190 sccm	0.232 ± 0.104

▪ Effetto del plasma sulla fase cristallina del PVDF

Per valutare le modifiche operate dal plasma sulle fasi cristalline presenti nei campioni di PVDF sottoposti ai trattamenti 2_30 e 3_0 sono stati acquisiti gli spettri FTIR-ATR. Gli spettri (figura 4.13) ottenuti da tutti i campioni sono simili tra loro. Si osserva la presenza dei picchi caratteristici a 1275 cm^{-1} (assegnato alla fase β) e quelli a 614 e 763 cm^{-1} relativi alla fase α , non vi sono picchi dovuti alla presenza di altri gruppi funzionali non già presenti sul PVDF non trattato. Come si può notare dal grafico riportato in figura 4.13 non vi è fase γ nel campione trattato 3 minuti ed è pari a 0.5% nel campione 2_30 tutta la fase elettroattiva (rispettivamente

84.7% ed 87.2%) è costituita dalla sola fase cristallina TTTT β a causa della mancanza del picco a 1234 cm^{-1} .

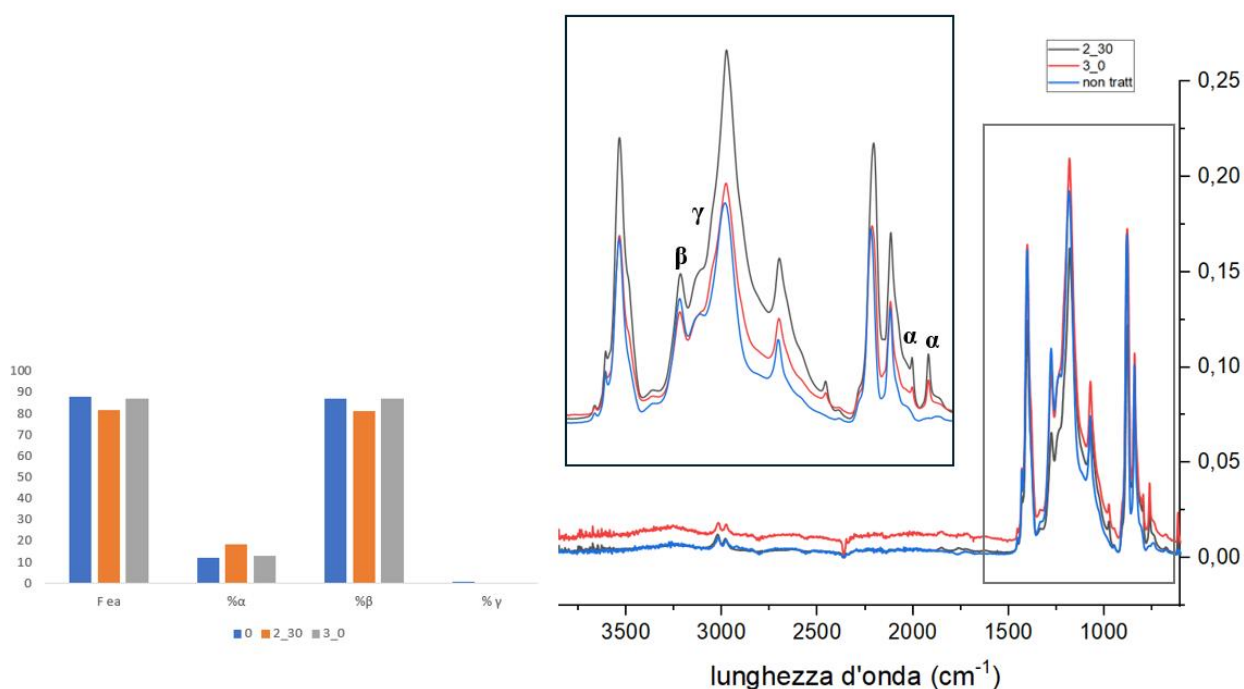


Figura 4.13: grafico della fase FEA, α , β e γ nei campioni non trattati e trattati con esp 2_30 e 3_0 con i relativi spettri FTIR-ATR

Facendo un confronto tra tutti i campioni analizzati si può notare come questi presentino elevati contenuti di fase β con valori compresi tra l'82 e il 94%. Il contenuto di fase elettroattiva rimane circa uguale o aumenta rispetto all'89% riscontrato nei campioni non trattati al plasma (tabella 4.7). Nel caso dell'esp 2_30 vi è un decremento del 0.94% della fase piezoelettrica rispetto al controllo. Per poter comprendere il motivo di questo decremento sono state graficate le percentuali delle fasi cristalline del PVDF in funzione della dose di plasma, calcolata in kJ come potenza per tempo di trattamento, (figura 4.14) poiché è noto che dosi elevate possano indurre riscaldamento superficiale nei campioni e portare ad un movimento cooperativo delle frazioni cristalline [112]. Sono stati valutati anche alcuni trattamenti relativi alla prima matrice sperimentale. Non è stata riscontrata alcuna influenza della dose sulla fase piezoelettrica delle fibre di PVDF ma in letteratura è stato riscontrato che una diminuzione fino al 20 % della fase β non è significativa rispetto alla piezoelettricità [112] e consente al materiale di avere comunque un coefficiente adeguato [116]. Questi dati sono un'ulteriore conferma del fatto che il trattamento al plasma opportunamente ottimizzato non intacca le proprietà massive delle membrane di PVDF pur inducendo una modifica superficiale che mira ad una migliore integrazione nell'ambiente biologico.

Tabella 4.7: Fasi α , β e γ degli esperimenti 0,4,7,8,20,25,27,2_30,3_0

esperimento	dose [kJ]	% β	% γ	% α	dev.st(β)	dev.st(γ)	dev.st(α)
0	0	85.5	3.6	10.8	2.7	0.5	3.2
4	19.53	91.5	2.62	5.8	2.2	0.2	2.7
7	54	90.1	0	9.9	0.7	0.0	0.8
8	54	89.8	0.79	9.4	1.2	0.2	1.6
20	9	89.6	1.0	9.3	7.9	0.7	10.5
25	19.53	93.3	1.7	5.0	0.7	0.0	0.8
27	54	92.2	1.1	7.0	0.4	0.2	0.8
2_3	6.75	84.7	0	15.3	7.5	0.0	7.5
3_0	8.1	87	0	13	6.0	0.0	6.0

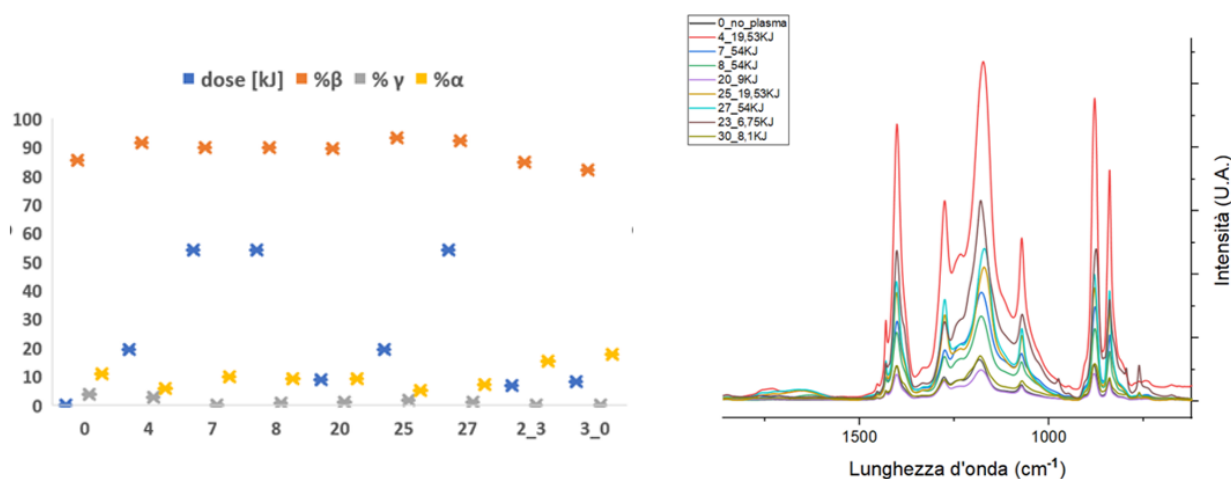


Figura 4.14: grafico che confronta dose, fase α , β e γ degli esperimenti 0,4,7,8,20,25,27,2_30,3_0 con i relativi spettri FTIR-ATR

▪ Caratterizzazione meccanica

Il PVDF oltre che per il polimorfismo è stato molto studiato ed impiegato per le straordinarie proprietà meccaniche. Lo scopo di questo lavoro era quello di innescare attraverso i trattamenti al plasma una modifica che interessasse i soli strati superficiali di PVDF senza scalfire la complicata gerarchia tra strati cristallini e amorfi che lo contraddistingue. In figura 4.15 sono mostrate le curva sforzo- deformazione derivanti dalle prove di trazione a cui sono state sottoposte le membrane non trattate e quelle modificate superficialmente con il trattamento 3_0. Si può osservare, come ci si aspettava dalla natura del PVDF, l'andamento tipico di un polimero semicristallino che va in contro a rottura duttile. La frattura duttile è imputabile al superamento della temperatura di transizione vetrosa. I dati valutati dalle suddette curve e riassunti in tabella 4.8 hanno evidenziato che il trattamento scelto non intacca le proprietà massive del materiale

poiché il modulo di Young (E), l'elongazione totale (%) e il carico di snervamento delle membrane pre e post trattamento non mostrano differenze significative.

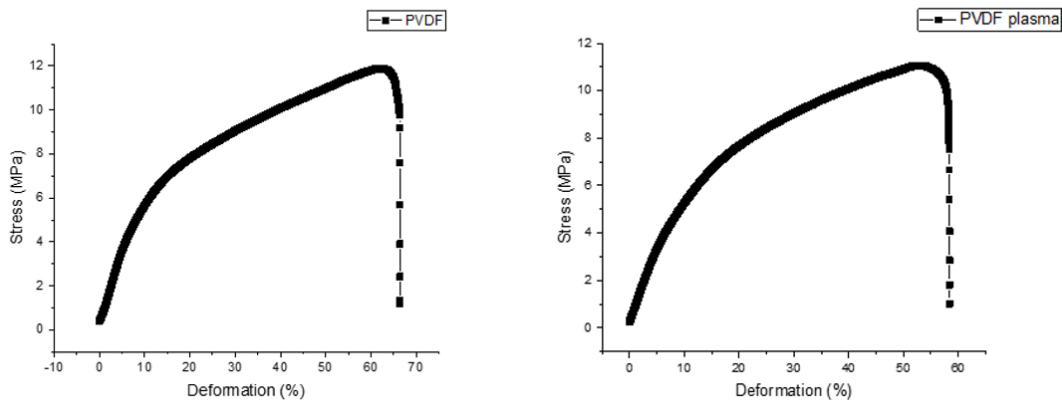


Figura 4.15: curve sforzo-deformazione delle membrane di PVDF non trattate (a sinistra) e post trattamento 3_0 (a destra)

Tabella 4.8: Modulo di Young, elongazione e carico di snervamento delle membrane pre e post trattamento 3_0

Campione	E [MPa]	Elong [%]	Carico di snervamento [MPa]
Non trattato	65±12	63±2	11±2
Trattato con esp 3_0	62±12	59.6±3.7	10.7±1

▪ Test di stabilità del trattamento

I campioni trattati 150 s, 45 W, O₂, 0.5 mbar hanno mostrato comportamento superidrofilico al controllo a tre mesi in tutti e tre i mezzi di conservazione considerati. Questo dato indica l'ottima durabilità e la stabilità della modifica superficiale effettuata con il plasma anche nel medio termine. Il tempo di residenza medio dei campioni conservati 3 mesi in TRIZMA resta uguale a quello valutato dopo 28 giorni (tabella 4.9).

Tabella 4.9: tempo di residenza sui campioni dell'esperimento 2_30

ARIA	2.4±1.1s
TRIZMA	0.82±0.1s
VUOTO	1.90±0.35s

4.2 Substrati di silicone

I siliconi sono ampiamente usati nei dispositivi impiantabili per il drenaggio dell'UA nonostante la scarsa bagnabilità superficiale poiché ipoallergenici, chimicamente inerti, morbidi, flessibili, trasparenti e permeabili ai gas. La presenza di gruppi metilici (-CH₃), che li caratterizza, non solo ne determina un comportamento spiccatamente idrofobico ma porta ad un decremento della biocompatibilità e spesso, ad un adsorbimento aspecifico delle proteine

con cui interagiscono nella prima fase postimpianto [60], [75], [117]. In questo lavoro di tesi si è scelto di utilizzare un silicone medical grade bicomponente commerciale al fine di valutare la possibilità di migliorarne le caratteristiche superficiali, tenendo intatte le proprietà massive che spesso rendono questo tipo di polimero elastomerico la scelta ottima per la realizzazione dei DDG. Tutti i campioni di SILPURAN, durante la valutazione morfologica al SEM, hanno mostrato superfici lisce ed omogenee (figura 4.16), come ci si aspettava dalla letteratura [75] La valutazione dell'angolo di contatto ha confermato il comportamento idrofobico con WCA medio di $92.8\pm 3^\circ$.

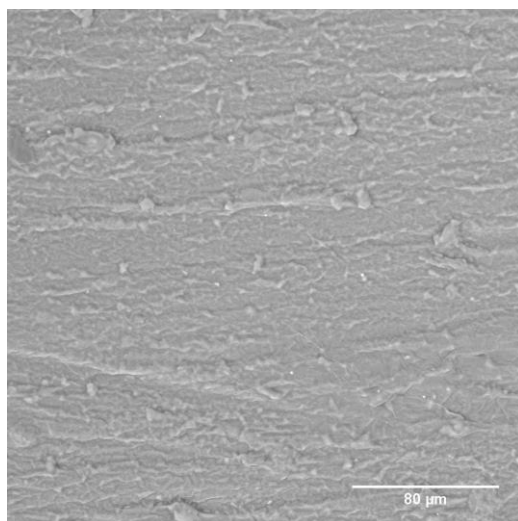


Figura 4.16: Immagine al SEM campioni di SILPURAN

4.5 Modello del DoE per i trattamenti al plasma sul SILPURAN

I risultati ottenuti dagli esperimenti previsti dalla matrice stilata, mostrati nella tabella 4.10, sono stati quelli utilizzati per la formulazione del modello che meglio approssima lo spazio sperimentale sondato.

Tabella 4.10: Matrice sperimentale con risposta misurata per ogni trattamento

Esperimento	Dose [kJ]	Tempo [s]	Potenza [W]	Pressione [mbar]	WCA [°]
1	1.35	30	45	0.1	39 ±10.5
2	8.1	180	45	0.1	18.4±2.5
3	6.3	30	210	0.1	32.5±2.3
4	37.8	180	210	0.1	40.5±17.5
5	1.35	30	45	0.5	29.9±8.8
6	8.1	180	45	0.5	40.6±4.5
7	6.3	30	210	0.5	83.8±7.6
8	37.8	180	210	0.5	39.4±23.2
9	13.23	105	126	0.3	67.4±4.3
10	13.23	105	126	0.3	63.1±2.8
11	13.23	105	126	0.3	53.4±3.3

Una volta ottenuti i dati sperimentali su cui provare ad ottenere un modello, sono state calcolate le dosi di plasma a cui sono stati sottoposti i campioni di silicone e tramite un grafico (figura 4.17) si è valutata l'influenza dei parametri potenza e tempo sulla diminuzione dell'angolo di contatto. Non è stata trovata però alcuna correlazione tra dose di plasma e abbassamento di WCA.

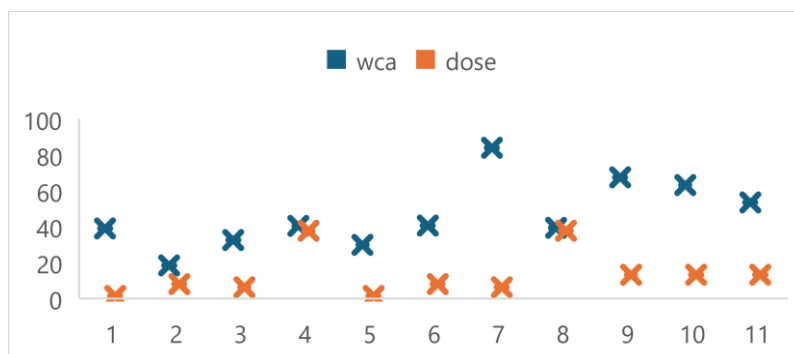


Figura 4.17: grafico che confronta dose e WCA nei trattamenti del DoE sul SILPURAN

▪ Analisi dei dati e stima del modello

Per la soluzione del modello è stata scelta la regressione multilineare. Il modello ha $R^2=0.377$, $Q^2=-0.02$, model validity= 0.45 e reproducibility= 0.86 come mostrato in figura 4.18. Questi dati indicano che l'errore sperimentale è basso ma il modello presenta problemi di predizione (Q^2 negativo).

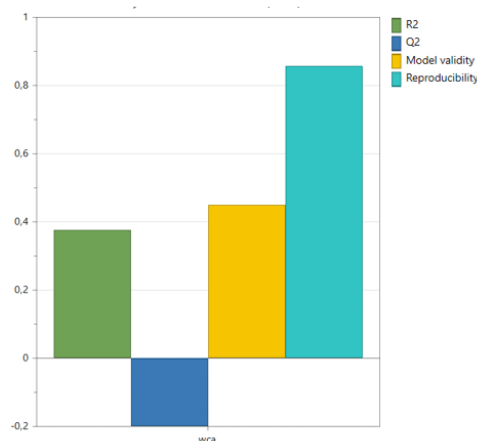


Figura 4.18: Diagramma dei parametri R2, Q2, MV, Rip modello SILPURAN

Osservando il diagramma dei coefficienti in figura 4.19 si può notare che Potenza e pressione sono le due variabili leggermente significative nell'abbassamento dell'angolo di contatto. Entrambe queste variabili hanno valori positivi che ci inducono a pensare che per ottenere una modifica superficiale migliore bisogna lavorare a basse pressioni e con potenze non elevate. La variabile tempo non è significativamente diversa da zero quindi non è possibile fare delle considerazioni sul possibile effetto di quest'ultima sull'incremento della bagnabilità superficiale dei substrati di silicone trattati al plasma.

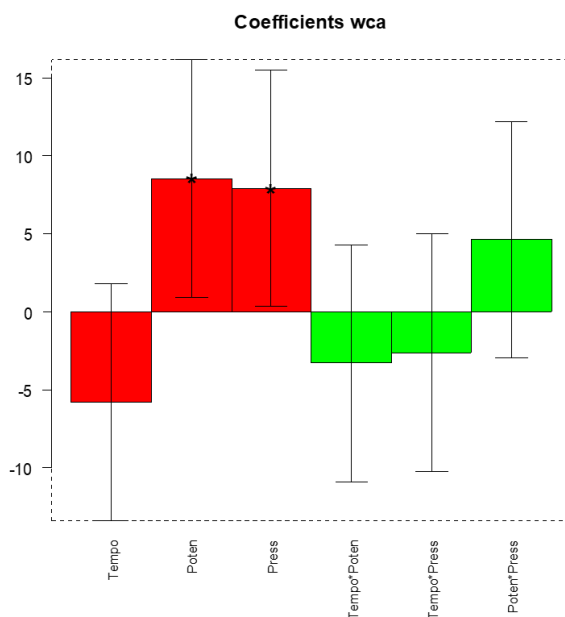


Figure 4.19: Diagramma dei coefficienti del modello

Le stesse considerazioni possono essere fatte osservando le superfici di risposta (figura 4.20) che mostrano un andamento lineare del modello in esame che non è stato possibile validare a causa della scarsa predittività.

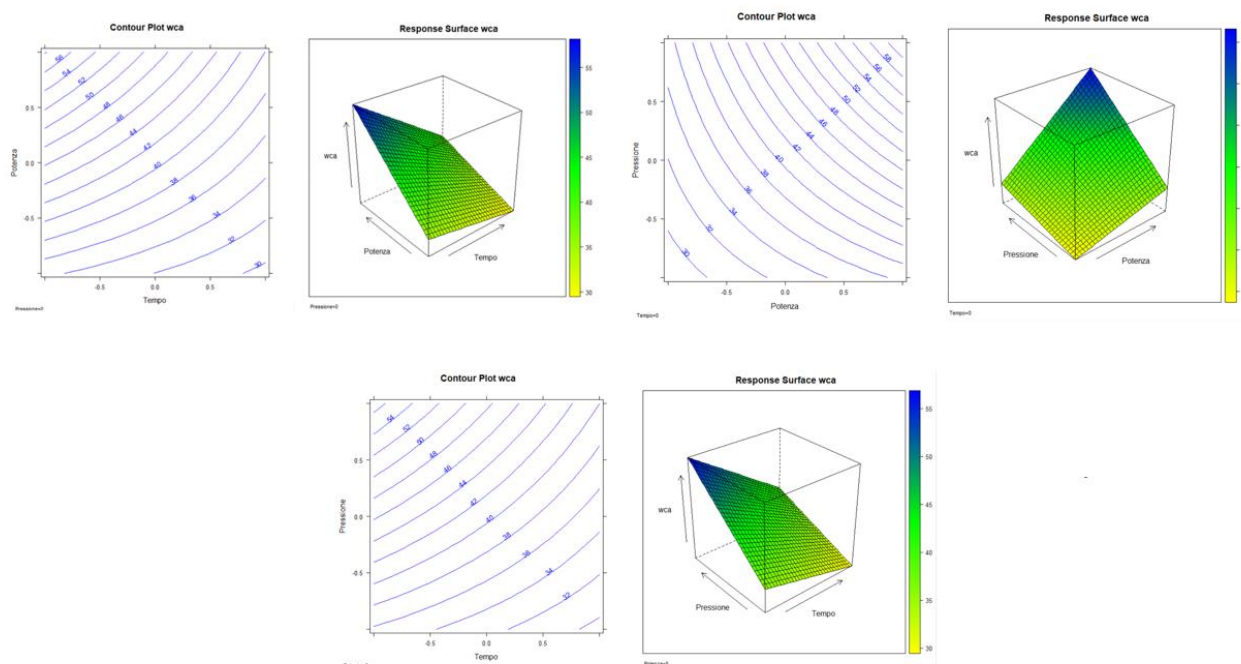


Figure 4.20: Superfici di risposta

▪ Caratterizzazione morfologica al SEM

I campioni di silicone trattati al plasma sono stati osservati al SEM per valutare eventuali cambiamenti della morfologia rispetto al controllo e verificare la presenza di microcricche. Più gruppi [92], [118] infatti studiando l'effetto dei trattamenti al plasma sul silicone hanno

riscontrato che sulla superficie modificata con ossigeno si viene a creare una crosta sottile simile alla silice che va in contro a fessurazione a causa della tensione di trazione residua nel materiale sottoposto al trattamento al plasma. Durante l'interazione con il gas il materiale subisce una fase di riscaldamento/espansione seguita dal raffreddamento fino a temperatura ambiente appena cessa il trattamento. In tutti i campioni osservati è stata riscontrata la presenza di pattern di fessure superficiali, come possibile vedere in figura 4.21 che invece non ci sono sul campione di controllo la cui superficie risulta omogenea.

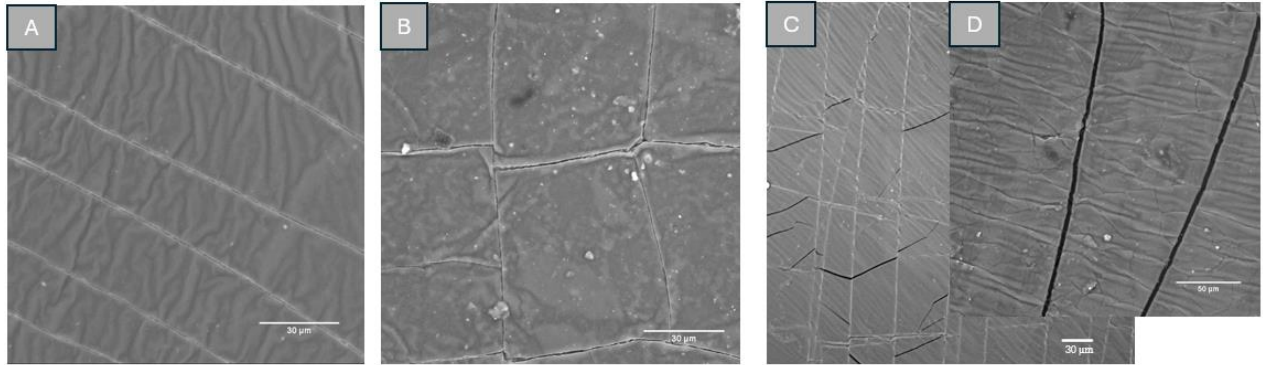


Figura 4.21: immagini SEM dei campioni di SILPURAN trattati al plasma 180s, 210W, O₂ e 0,5 mbar (A), 30 s, 210 W, O₂ e 0,5 mbar (B) e 180s,45W, O₂ e 0,1 mbar (C), (D) ingrandimento, marker 30μm A-C e 50 μm per D

Sono state calcolate le distanze medie tra le varie fessure ed è stata valutata la rugosità superficiale dei campioni (tabella 4.11).

Tabella 4.11: distanze medie tra fessurazioni e rugosità dei campioni di SILPURAN trattati al plasma

	non trattato	180s, 210W, O ₂ e 0,5 mbar	30 s, 210 W, O ₂ e 0,5 mbar	180s,45W, O ₂ e 0,1 mbar
dose [kJ]	0	37.8	6.3	8.1
Sa [μm]	2.86	3.03	0.808	0.894
Distanza tra scanalature [μm]		29.1 ±8.1		
Larghezza scanalature[μm]		0.88 ±0.19		
Larghezza media cella[μm]			57,8 ± 14.1	
Altezza media cella[μm]			65.1±22.2	
Distanza scanalature[μm]				29.94 ±15.7
Larghezza scanalature meno profonde (C) [μm]				1.6 ± 0.27
Larghezza scanalature profonde (D) [μm]				3.83 ± 0.68

I campioni sottoposti ad una dose bassa di plasma hanno rugosità superficiale inferiore rispetto al controllo in accordo con quanto riscontrato in letteratura [92] e le cricche indotte sulla superficie si dispongono parallelamente le une alle altre. Il campione trattato agli estremi degli intervalli di tempo, potenza e pressione mostra invece una Sa superiore al campione non trattato e una fessurazione a cellette. I trattamenti al plasma pur non essendo efficaci nell'indurre un aumento della bagnabilità dei campioni di silicone nel tempo potrebbero svolgere un ruolo cruciale nel favorire l'interazione dell'impianto con l'ambiente biologico poiché in grado di modificare la topografia superficiale degli stessi. Le crepe che si formano spontaneamente sulla superficie del silicone potrebbero essere utilizzate, se controllate adeguatamente, come fattori immunomodulati. Elementi isotropici di dimensioni micrometriche, infatti, se disposti simmetricamente in un pattern regolare possono regolare l'adesione dei fibroblasti e quindi ridurre il rischio di incapsulamento fibrotico [105], [118].

▪ **Caratterizzazione chimico-fisica: spettroscopia FTIR-ATR**

Stabilità termica, inerzia chimica e flessibilità sono caratteristiche che i siliconi posseggono a causa dell'elevata energia del legame Si-O, unità ripetitiva di cui sono composti questo tipo di polimeri. Le basse forze intermolecolari dei gruppi metilici pendenti sono invece la causa del comportamento idrofobico e della bassa bagnabilità. Per tentare di aumentare la polarità superficiale bisogna indurre una rottura e conseguente ossidazione dei gruppi metilici [92]. Per verificare la modifica superficiale indotta dai trattamenti al plasma sono stati acquisiti gli spettri FTIR-ATR dei campioni che hanno riportato rispettivamente il WCA minore 18.4° (trattamento 180s, 45W, 0.1 mbar, O₂) e maggiore 83.8±7.6 (con trattamento 30s, 210W, 0.5 mbar, O₂) e quelli trattati agli estremi dell'intervallo di variabilità di ciascuna variabile selezionata per il DoE (180s, 210W, 0.5 mbar, O₂). Tutti i dati acquisiti sono stati confrontati con quelli dei campioni di controllo. Come si può osservare in figura 4.22 gli spettri mostrano tutti i picchi caratteristici del gruppo CH₃ a 2962.65 cm⁻¹, CH₂ a 1410 cm⁻¹, Si-CH₃ a 1260 cm⁻¹ e 864,27 cm⁻¹, Si-O-Si rispettivamente a 1080 cm⁻¹ e 1009,28 cm⁻¹, Si-C/CH₃ a 787.39 cm⁻¹ [119], [120]. Non si sono osservate differenze significative nei vari campioni.

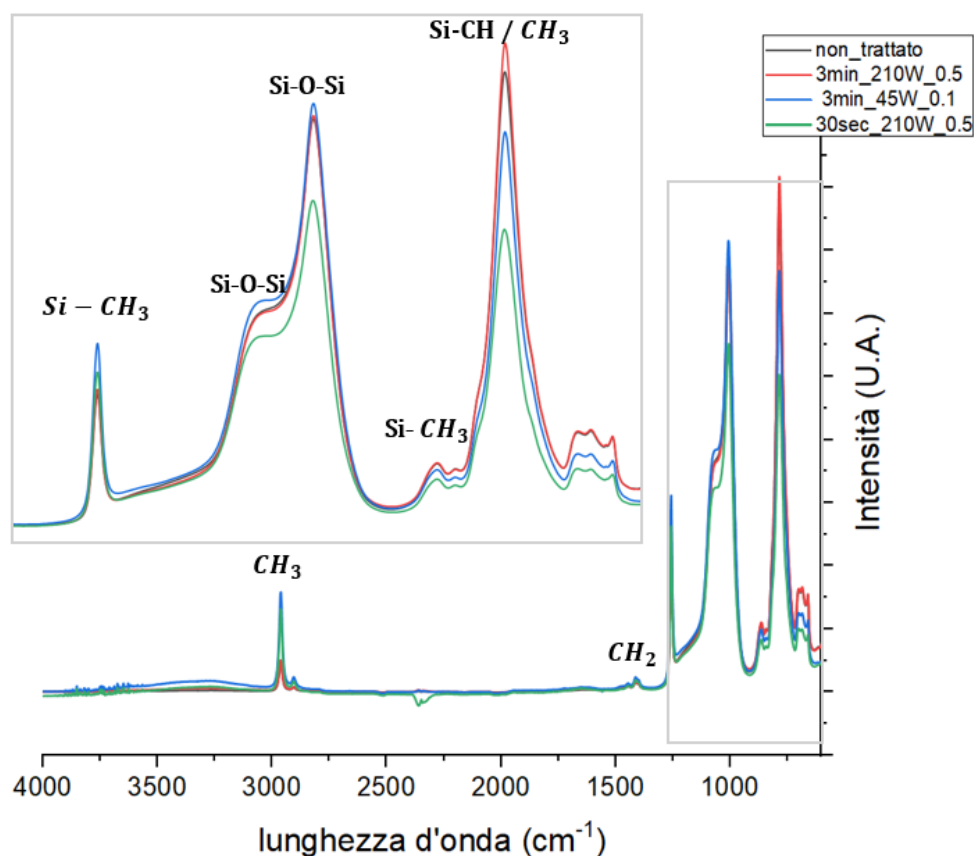


Figura 4.22: spettri FTIR-ATR dei campioni di silicone non trattato, trattato 180s, 45W, 0.1 mbar, O₂; 30s, 210W, 0.5 mbar, O₂ e 180s, 210W, 0.5 mbar, O₂

Osservando tutti i dati il trattamento migliore per modificare la superficie del silicone di grado medico da un punto di vista morfologico risulta essere: 180s, 45W, 0.1 mbar, O₂. Purtroppo, non si è riusciti ad ottenere un trattamento che inducesse un incremento della bagnabilità duratura nel tempo ma questo trattamento ha portato un decremento dell'angolo di contatto, valutato subito dopo il trattamento, pari a circa l'80% e ad una morfologia con pattern regolari di scanalature parallele. Questi trattamenti potrebbero essere impiegati per ottenere delle modifiche topografiche volte a migliorare la loro funzionalità come dispositivo per la gestione del glaucoma.

5. CONCLUSIONI E PROSPETTI FUTURI

Negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi nuovi materiali funzionali per possibili impiego nel trattamento del glaucoma. Sfruttando infatti le tecniche di funzionalizzazione superficiale si possono controllare ed indirizzare le reazioni che naturalmente avvengono all'interfaccia tra materiale esogeno e proteina quando quest'ultimo viene impiantato. Al fine di evitare l'incapsulamento fibrotico del dispositivo e il suo conseguente fallimento è bene predisporre un DDG con superficie idrofilica, soprattutto se l'obiettivo è quello di sfruttare le tecniche MIGS per l'impianto nello spazio supracoroidale [100]. In questo lavoro per raggiungere tale scopo sono stati studiati trattamenti al plasma di ossigeno e argon per modificare la bagnabilità di membrane in PVDF e campioni di SILPURAN, naturalmente idrofobici. Il DoE che ha guidato tutto il processo di ottimizzazione, pur restituendo un modello non validabile a causa della scarsa predicibilità, ha portato a selezionare su entrambe i materiali dei trattamenti al plasma con O₂ a bassa pressione. Il trattamento migliore per trattare le membrane di PVDF è risultato essere il seguente: 180s, 45W, O₂, 190 sccm (0.5 mbar). Questo trattamento induce una modifica superficiale efficace su campioni di ogni dimensione (compatibilmente con la camera dello strumento utilizzato), garantisce elevata bagnabilità delle membrane, e comportamento superidrofilico che si mantiene nel tempo. Il trattamento selezionato è inoltre riproducibile, ripetibile, non induce danni morfologici alle membrane, garantisce buona maneggiabilità e preserva la fase elettroattiva caratteristica del materiale. L'effetto superidrofilico attribuibile, all'introduzione di composti a base di ossigeno e ad una diminuzione del contenuto di fluoro sulla superficie delle fibre polimeriche porta a una riduzione dell'angolo di contatto fino a tre mesi non intacca le proprietà massive del PVDF. Sono necessari test di vitalità cellulare in presenza di citochine e chemochine per valutare se la modifica superficiale è in grado di esercitare potere antifibrotico desiderato e di indurre, in vitro, una risposta di riparazione tissutale funzionale senza eccessive deposizioni di collagene, fibronectina (FN), fibrillina e acido ialuronico sul substrato polimerico [117]. Restano da valutare possibili sviluppi di nuovi dispositivi che prevedano l'utilizzo di membrane di PVDF come sensori di regolazione della eccessiva filtrazione che spesso inducono ipotonizzazione pazienti post impianto di dispositivo drenante. Il trattamento migliore per modificare la superficie del silicone di grado medico SILPURAN da un punto di vista morfologico risulta essere: 180s, 45W, 0.1 mbar, O₂. Purtroppo, non si è riusciti ad ottenere un trattamento che inducesse un incremento della bagnabilità duratura nel tempo. Restano necessarie analisi XPS per valutare la creazione di strati di silice a seguito dei trattamenti al plasma con ossigeno, come riportato da studi in letteratura. Il trattamento scelto però ha portato un decremento dell'angolo di contatto, valutato subito dopo il trattamento, pari a circa l'80% e ad una riduzione della rugosità superficiale e ad una morfologia con pattern regolari di scanalature parallele che potrebbe essere sfruttata per indirizzare la corretta adesione cellulare. Questi trattamenti potrebbero essere impiegati, studiando ulteriormente la creazione di microfessurazioni utili ad impartire la corretta segnalazione cellulare e il rapporto tra la dose di plasma e la modifica morfologica indotta, per ottenere delle superfici con funzionalità immunomodulanti dei dispositivi per la gestione del glaucoma.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Križaj, «What is glaucoma?», in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, e R. Nelson, A c. di, Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center, 1995. Consultato: 23 novembre 2023. [Online]. Disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK543075/>
- [2] Vallario M., Barnini C., *Glaucoma, apriamo gli occhi sulla malattia*. Edra, 2018.
- [3] M. Tsatsos e D. Broadway, «Controversies in the history of glaucoma: is it all a load of old Greek?», *Br J Ophthalmol*, vol. 91, fasc. 11, pp. 1561–1562, nov. 2007, doi: 10.1136/bjo.2007.114298.
- [4] C. and developed by B. S.-A. R. Bortolotti Ivan Bosnjak, Andrea Contesini, Alessio e F. Badalà, «Intervento di Cataratta: Tutte le Cose da Sapere», *Micro Chirurgia Oculare*. Consultato: 26 gennaio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.microchirurgiaoculare.com/cataratta/laser-interventi/>
- [5] C. T. Leffler, S. G. Schwartz, F. M. Giliberti, M. T. Young, e D. Bermudez, «What was Glaucoma Called Before the 20th Century?», *Ophthalmol Eye Dis*, vol. 7, pp. 21–33, ott. 2015, doi: 10.4137/OED.S32004.
- [6] S.-A. Liu, Z.-N. Zhao, N.-N. Sun, Y. Han, J. Chen, e Z.-G. Fan, «Transitions of the Understanding and Definition of Primary Glaucoma», *Chin Med J (Engl)*, vol. 131, fasc. 23, pp. 2852–2859, dic. 2018, doi: 10.4103/0366-6999.246069.
- [7] «A practical treatise on the diseases of the eye - Digital Collections - National Library of Medicine». Consultato: 10 gennaio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-67961110R-bk>
- [8] «World Glaucoma Week » What is glaucoma?» Consultato: 23 novembre 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.worldglaucomaweek.org/what-is-glaucoma/>
- [9] «Overview of Glaucoma - Eye Disorders», MSD Manual Professional Edition. Consultato: 23 novembre 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.msmanuals.com/professional/eye-disorders/glaucoma/overview-of-glaucoma>
- [10] *EGS-European Glaucoma Society ,Terminology and Guidelines For Glaucoma- 5th Edition*. 2021.
- [11] Y.-C. Tham, X. Li, T. Y. Wong, H. A. Quigley, T. Aung, e C.-Y. Cheng, «Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis», *Ophthalmology*, vol. 121, fasc. 11, pp. 2081–2090, nov. 2014, doi: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013.
- [12] J. Dietze, K. Blair, e S. J. Havens, «Glaucoma», in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Consultato: 23 novembre 2023. [Online]. Disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538217/>
- [13] «Anatomia dell'occhio - Disturbi oculari», Manuali MSD Edizione Professionisti. Consultato: 26 gennaio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-oculari/approccio-al-paziente-oftalmologico/anatomia-dell-occhio?query=occhio%20anatomia>
- [14] Amedeo Lucente, *CENNI DI ANATOMIA E FISIOLOGIA OCULARE*. [Online]. Disponibile su: <https://www.amedeolucente.it/pdf/Dispensa-anatomia.pdf>
- [15] Amedeo Lucente, *COMPENDIO DI OCULISTICA*. [Online]. Disponibile su: <https://www.amedeolucente.it/public/compendio%20di%20oculistica.pdf>
- [16] Nikos G. Tsioumas M.D., *IL GLAUCOMA*. [Online]. Disponibile su: www.tsioumas.gr

- [17] Khurana, A., Khurana, A. K., Khurana, A. K., Khurana, B. P., *Comprehensive Ophthalmology (A Free Companion: Review Of Ophthalmology)*. India: Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Limited., 2019.
- [18] D. K. Sunderland e A. Sapra, «Physiology, Aqueous Humor Circulation», in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Consultato: 23 novembre 2023. [Online]. Disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553209/>
- [19] T. S. Acott *et al.*, «Intraocular pressure homeostasis: maintaining balance in a high-pressure environment», *J Ocul Pharmacol Ther*, vol. 30, fasc. 2–3, pp. 94–101, 2014, doi: 10.1089/jop.2013.0185.
- [20] G. A. Lyubimov, I. N. Moiseeva, and A. A. Stein, *Dynamics of the Intraocular Fluid: Mathematical Model and Its Main Consequences*, ISSN 0015-4628, Fluid Dynamics, 2007, Vol. 42, No. 5, pp. 684–694. © Pleiades Publishing, Ltd., 2007. Original Russian Text © G.A. Lyubimov, I.N. Moiseeva, A.A. Stein, 2007, Published in *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk, Mekhanika Zhidkosti i Gaza*, 2007, Vol. 42, No. 5, 7–18. doi: 10.1134/S001546280705002X.
- [21] M. Dvoriashyna, A. J. E. Foss, E. A. Gaffney, e R. Repetto, «Chapter 13 - Mathematical models of water transport across ocular epithelial layers», in *Modeling of Mass Transport Processes in Biological Media*, S. Becker, A. V. Kuznetsov, F. de Monte, G. Pontrelli, e D. Zhao, A. c. di, Academic Press, 2022, pp. 405–433. doi: 10.1016/B978-0-323-85740-6.00002-9.
- [22] *E.M. Landis and J.R. Pappenheimer, "Exchange of Substances through the Capillary Wall," in Handbook of Physiology, Vol. 2 (Amer. Physiol. Soc., Washington, 1963), 961–1034.*
- [23] J. Ahlqvist, «Plasma protein osmotic pressure equations for humans», *Journal of Applied Physiology*, vol. 94, fasc. 3, pp. 1288–1289, mar. 2003, doi: 10.1152/jappphysiol.00694.2002.
- [24] «Glaucoma | Patologie Visive». Consultato: 23 novembre 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.sedesoi.com/patologie-visive-glaucoma/>
- [25] Amedeo Lucente, *ANATOMO-FISIOLOGIA-DELLAPPARATO-VISIVO*. [Online]. Disponibile su: <https://www.amedeolucente.it/pdf/ANATOMO-FISIOLOGIA-DELLAPPARATO-VISIVO>.
- [26] «Kanski's Clinical Ophthalmology - 9th Edition». Consultato: 23 novembre 2023. [Online]. Disponibile su: <https://shop.elsevier.com/books/kanskis-clinical-ophthalmology/salmon/978-0-7020-7711-1>
- [27] Alessandro Bagnis, Carlo Enrico Traverso, *Glaucoma ad angolo chiuso: una malattia, molte malattie*.
- [28] Peter Frampton., «Tonometry: A Study in Biomechanical Modelling.», Thesis for the Ophthalmic Doctorate, Aston University, Birmingham, England, United Kingdom, 2017.
- [29] U. Yolcu, A. Ilhan, A. Tas, U. Yolcu, A. Ilhan, e A. Tas, «Conventional Intraocular Pressure Measurement Techniques», in *Glaucoma - Intraocular Pressure and Aqueous Dynamics*, IntechOpen, 2016. doi: 10.5772/67045.
- [30] Amedeo Lucente, «oct e glaucoma». [Online]. Disponibile su: <https://www.amedeolucente.it/pdf/oct-e-glaucoma>
- [31] «Spiegazione-OCT». [Online]. Disponibile su: <http://www.bioscienze.net/wp-content/uploads/2018/05/Spiegazione-OCT>
- [32] Redazione, «Glaucoma: metodi di identificazione e misurazione della progressione perimetrica», *EYE DOCTOR*. Consultato: 5 dicembre 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.eyedoctor.it/articoli-scientifici/metodi-di-identificazione-e-misurazione-della-progressione-perimetrica-in-soggetti-affetti-da-glaucoma/>

- [33] U. F. O. Themes, «Glaucoma», Ento Key. Consultato: 9 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://entokey.com/glaucoma-26/>
- [34] K. D. Patel *et al.*, «Recent advances in drug delivery systems for glaucoma treatment», *Materials Today Nano*, vol. 18, p. 100178, giu. 2022, doi: 10.1016/j.mtnano.2022.100178.
- [35] M. H. Akhter *et al.*, «Drug Delivery Challenges and Current Progress in Nanocarrier-Based Ocular Therapeutic System», *Gels*, vol. 8, fasc. 2, Art. fasc. 2, feb. 2022, doi: 10.3390/gels8020082.
- [36] R. J. Casson, «Medical therapy for glaucoma: A review», *Clinical & Experimental Ophthalmology*, vol. 50, fasc. 2, pp. 198–212, 2022, doi: 10.1111/ceo.13989.
- [37] Y.-T. Liao, C.-H. Lee, S.-T. Chen, J.-Y. Lai, e K. C.-W. Wu, «Gelatin-functionalized mesoporous silica nanoparticles with sustained release properties for intracameral pharmacotherapy of glaucoma», *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, fasc. 34, pp. 7008–7013, ago. 2017, doi: 10.1039/C7TB01217A.
- [38] L.-J. Luo, D. D. Nguyen, e J.-Y. Lai, «Dually functional hollow ceria nanoparticle platform for intraocular drug delivery: A push beyond the limits of static and dynamic ocular barriers toward glaucoma therapy», *Biomaterials*, vol. 243, p. 119961, giu. 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119961.
- [39] Y. Agban, J. Lian, S. Prabakar, A. Seyfoddin, e I. D. Rupenthal, «Nanoparticle cross-linked collagen shields for sustained delivery of pilocarpine hydrochloride», *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 501, fasc. 1, pp. 96–101, mar. 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.01.069.
- [40] M. Shokry, R. M. Hathout, e S. Mansour, «Exploring gelatin nanoparticles as novel nanocarriers for Timolol Maleate: Augmented *in-vivo* efficacy and safe histological profile», *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 545, fasc. 1, pp. 229–239, lug. 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.04.059.
- [41] X. Pan, X. Liu, X. Zhuang, Y. Liu, e S. Li, «Co-delivery of dexamethasone and melatonin by drugs laden PLGA nanoparticles for the treatment of glaucoma», *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 60, p. 102086, dic. 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.102086.
- [42] C.-H. Lee, Y.-J. Li, C.-C. Huang, e J.-Y. Lai, «Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule carriers with sustained drug release: single dose for long-term glaucoma treatment», *Nanoscale*, vol. 9, fasc. 32, pp. 11754–11764, 2017, doi: 10.1039/C7NR03221H.
- [43] M. V. Fedorchak, I. P. Conner, J. S. Schuman, A. Cugini, e S. R. Little, «Long Term Glaucoma Drug Delivery Using a Topically Retained Gel/Microsphere Eye Drop», *Sci Rep*, vol. 7, fasc. 1, p. 8639, ago. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-09379-8.
- [44] S. Behtaj, F. Karamali, S. Najafian, E. Masaali, M.-H. N. Esfahani, e M. Rybachuk, «The role of PGS/PCL scaffolds in promoting differentiation of human embryonic stem cells into retinal ganglion cells», *Acta Biomaterialia*, vol. 126, pp. 238–248, mag. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.03.036.
- [45] J. B. Ciolino *et al.*, «*In vivo* performance of a drug-eluting contact lens to treat glaucoma for a month», *Biomaterials*, vol. 35, fasc. 1, pp. 432–439, gen. 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.032.
- [46] «La terapia laser per il glaucoma», Studio Oculistico d’Azeglio. Consultato: 12 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.studiodazeglio.it/patologie-e-interventi/glaucoma/la-terapia-laser-per-il-glaucoma/>
- [47] «La terapia chirurgica per il glaucoma», Studio Oculistico d’Azeglio. Consultato: 12 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.studiodazeglio.it/patologie-e-interventi/glaucoma/la-terapia-chirurgica-per-il-glaucoma/>

- [48] «GONIOTOMIA - Dizionario medico», Dica33 salute e medicina a portata di click. Consultato: 12 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.dica33.it/dizionario-medico/25429/goniotomia.asp>
- [49] Redazione, «Trabeculotomia ab interno mediante visualizzazione gonioscopica», EYE DOCTOR. Consultato: 12 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.eyedoctor.it/articoli-scientifici/trabeculotomia-ab-interno-mediante-visualizzazione-gonioscopica/>
- [50] «Centro Italiano Glaucoma - Sclerectomia Profonda». Consultato: 12 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.centroitalianoglaucoma.it/sclerectomia.html>
- [51] M. Balas e D. J. Mathew, «Minimally Invasive Glaucoma Surgery: A Review of the Literature», *Vision (Basel)*, vol. 7, fasc. 3, p. 54, ago. 2023, doi: 10.3390/vision7030054.
- [52] E. Saeed, K. Gołaszewska, D. A. Dmuchowska, R. Zalewska, e J. Konopińska, «The PreserFlo MicroShunt in the Context of Minimally Invasive Glaucoma Surgery: A Narrative Review», *Int J Environ Res Public Health*, vol. 20, fasc. 4, p. 2904, feb. 2023, doi: 10.3390/ijerph20042904.
- [53] H. Saheb e I. I. K. Ahmed, «Micro-invasive glaucoma surgery: current perspectives and future directions», *Curr Opin Ophthalmol*, vol. 23, fasc. 2, pp. 96–104, mar. 2012, doi: 10.1097/ICU.0b013e32834ff1e7.
- [54] «American Glaucoma Society Position Paper: Microinvasive Glaucoma Surgery - Ophthalmology Glaucoma». Consultato: 12 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: [https://www.ophtalmologyglaucoma.org/article/S2589-4196\(19\)30361-8/fulltext](https://www.ophtalmologyglaucoma.org/article/S2589-4196(19)30361-8/fulltext)
- [55] J. Caprioli *et al.*, «Special Commentary: Supporting Innovation for Safe and Effective Minimally Invasive Glaucoma Surgery: Summary of a Joint Meeting of the American Glaucoma Society and the Food and Drug Administration, Washington, DC, February 26, 2014», *Ophthalmology*, vol. 122, fasc. 9, pp. 1795–1801, set. 2015, doi: 10.1016/j.ophtha.2015.02.029.
- [56] «A comparison of iStent combined with phacoemulsification and endocyclophotocoagulation (ICE2) with the PreserFlo MicroShunt and XEN-45 implants - Umair Qidwai, Lee Jones, Gokulan Ratnarajan, 2022». Consultato: 12 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/25158414221125697>
- [57] I. Pereira, R. Wijdeven, H. Wyss, H. Beckers, e J. Toonder, «Conventional glaucoma implants and the new MIGS devices: a comprehensive review of current options and future directions», *Eye*, vol. 35, giu. 2021, doi: 10.1038/s41433-021-01595-x.
- [58] L. Chan *et al.*, «New Devices in Glaucoma», *Ophthalmol Ther*, vol. 12, fasc. 5, pp. 2381–2395, ott. 2023, doi: 10.1007/s40123-023-00780-3.
- [59] M. L. Salvetat e G. Beltrame, «Long Term Results of the Ex-PRESS P-200 Miniature Glaucoma Filtration Device in Primary and Secondary Glaucoma», *World Journal of Surgery and Surgical Research - Ophthalmology*, vol. 1, ago. 2018, Consultato: 12 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.surgeryresearchjournal.com/full-text/wjssr-v1-id1043.php>
- [60] A. Klézlová *et al.*, «Novel Biomaterials in Glaucoma Treatment», *Biomedicines*, vol. 12, fasc. 4, p. 813, apr. 2024, doi: 10.3390/biomedicines12040813.
- [61] «Electrospinning o elettrofilatura». Consultato: 9 gennaio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.chimica-online.it/materiali/fibre-tessili/electrospinning.htm>
- [62] «Electrospinning». [Online]. Disponibile su: <https://www.centropiaggio.unipi.it/sites/default/files/course/material/2013-12-13%20-%20Electrospinning.pdf>

- [63] A. Josyula *et al.*, «Nanofiber-based glaucoma drainage implant improves surgical outcomes by modulating fibroblast behavior», *Bioeng Transl Med*, vol. 8, fasc. 3, p. e10487, gen. 2023, doi: 10.1002/btm2.10487.
- [64] K. S. Parikh *et al.*, «Nano-structured glaucoma drainage implant safely and significantly reduces intraocular pressure in rabbits via post-operative outflow modulation», *Sci Rep*, vol. 10, fasc. 1, p. 12911, lug. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-69687-4.
- [65] J. L. Olson, R. Bhandari, S. Groman-Lupa, e R. Velez-Montoya, «A nanopore membrane regulator device for laser modulated flow after glaucoma surgery», *Biomed Microdevices*, vol. 17, fasc. 5, p. 90, ott. 2015, doi: 10.1007/s10544-015-9985-2.
- [66] I. A. Khalil, I. H. Ali, e I. M. El-Sherbiny, «Noninvasive Biodegradable Nanoparticles-in-Nanofibers Single-Dose Ocular Insert: In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Evaluation», *Nanomedicine*, vol. 14, fasc. 1, pp. 33–55, gen. 2019, doi: 10.2217/nnm-2018-0297.
- [67] A. Klapstova, J. Horakova, A. Shynkarenko, e D. Lukas, «Composite fibrous glaucoma drainage implant», *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, vol. 254, fasc. 6, p. 062006, ott. 2017, doi: 10.1088/1757-899X/254/6/062006.
- [68] A. Klapstova *et al.*, «A PVDF electrospun antifibrotic composite for use as a glaucoma drainage implant», *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 119, p. 111637, feb. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111637.
- [69] P. Saxena e P. Shukla, «A comprehensive review on fundamental properties and applications of poly(vinylidene fluoride) (PVDF)», *Advanced Composites and Hybrid Materials*, vol. 4, pp. 1–19, feb. 2021, doi: 10.1007/s42114-021-00217-0.
- [70] X. Cai, T. Lei, D. Sun, e L. Lin, «A critical analysis of the α , β and γ phases in poly(vinylidene fluoride) using FTIR», *RSC Adv.*, vol. 7, fasc. 25, pp. 15382–15389, mar. 2017, doi: 10.1039/C7RA01267E.
- [71] R. Dallaev, T. Pisarenko, D. Sobola, F. Orudzhev, S. Ramazanov, e T. Trčka, «Brief Review of PVDF Properties and Applications Potential», *Polymers*, vol. 14, fasc. 22, Art. fasc. 22, gen. 2022, doi: 10.3390/polym14224793.
- [72] Q. Qin *et al.*, «Development and material characteristics of glaucoma surgical implants», *Advances in Ophthalmology Practice and Research*, vol. 3, fasc. 4, pp. 171–179, nov. 2023, doi: 10.1016/j.aopr.2023.09.001.
- [73] A. Gapeeva *et al.*, «Tetrapodal ZnO-Based Composite Stents for Minimally Invasive Glaucoma Surgery», *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 9, fasc. 3, pp. 1352–1361, mar. 2023, doi: 10.1021/acsbiomaterials.2c01203.
- [74] «Our Technology | Spyglass Pharma». Consultato: 15 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.spyglasspharma.com/our-technology>
- [75] C. Windhövel *et al.*, «Comparison of Six Different Silicones In Vitro for Application as Glaucoma Drainage Device», *Materials (Basel)*, vol. 11, fasc. 3, p. 341, feb. 2018, doi: 10.3390/ma11030341.
- [76] L. Choritz, K. Koynov, G. Renieri, K. Barton, N. Pfeiffer, e H. Thieme, «Surface topographies of glaucoma drainage devices and their influence on human tenon fibroblast adhesion», *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 51, fasc. 8, pp. 4047–4053, ago. 2010, doi: 10.1167/iovs.09-4759.
- [77] D. Davi', «“Sviluppo di membrane polimeriche altamente porose e con proprietà antiadesive come potenziale dispositivo per la chirurgia mini-invasiva nel trattamento del glaucoma” = “Development of highly porous polymer membranes with anti-adhesive properties as a potential device for minimally invasive surgery in the treatment of glaucoma.”», laurea, Politecnico di Torino, 2023. Consultato: 15 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://webthesis.biblio.polito.it/29914/>
- [78] W. C. Ag, «Room Temperature Vulcanizing RTV Silicones».

- [79] C. G. Shao, N. R. Sinha, R. R. Mohan, e A. D. Webel, «Novel Therapies for the Prevention of Fibrosis in Glaucoma Filtration Surgery», *Biomedicines*, vol. 11, fasc. 3, Art. fasc. 3, mar. 2023, doi: 10.3390/biomedicines11030657.
- [80] C. Yu-Wai-Man e P. T. Khaw, «Developing novel anti-fibrotic therapeutics to modulate post-surgical wound healing in glaucoma: big potential for small molecules», *Expert Review of Ophthalmology*, vol. 10, fasc. 1, pp. 65–76, gen. 2015, doi: 10.1586/17469899.2015.983475.
- [81] M. Zhianmanesh, A. Gilmour, M. Bilek, e B. Akhavan, «Plasma surface functionalization: A comprehensive review of advances in the quest for bioinstructive materials and interfaces», *Applied Physics Reviews*, vol. 10, p. 021301, giu. 2023, doi: 10.1063/5.0130829.
- [82] P. Gibbon, «Introduction to Plasma Physics», gen. 2016, doi: 10.5170/CERN-2016-001.51.
- [83] *F.F. Chen, Plasma Physics and Controlled Fusion, 2nd ed. (Springer, New York, 2006).*
- [84] *R.O. Dendy (ed.), Plasma Physics: An Introductory Course (Cambridge University Press, Cambridge, 1993).*
- [85] P. K. Chu, J. Y. Chen, L. P. Wang, e N. Huang, «Plasma-surface modification of biomaterials», *Materials Science and Engineering: R: Reports*, vol. 36, fasc. 5, pp. 143–206, mar. 2002, doi: 10.1016/S0927-796X(02)00004-9.
- [86] A. Josyula *et al.*, «Nanofiber-based glaucoma drainage implant improves surgical outcomes by modulating fibroblast behavior», *Bioeng Transl Med*, vol. 8, fasc. 3, p. e10487, gen. 2023, doi: 10.1002/btm2.10487.
- [87] «Design-of-Experiment-DOE.pdf». [Online]. Disponibile su: <https://sites.unimi.it/gazzalab/wordpress/wp-content/uploads/2011/12/15-Design-of-Experiment-DOE.pdf>
- [88] «DOE – DESIGN OF EXPERIMENTS», Crossnova. Consultato: 10 gennaio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://crossnova.com/le-guide-operative/doe-design-of-experiments/>
- [89] B. C. Y. Lee, M. S. Mahtab, T. H. Neo, I. H. Farooqi, e A. Khursheed, «A comprehensive review of Design of experiment (DOE) for water and wastewater treatment application - Key concepts, methodology and contextualized application», *Journal of Water Process Engineering*, vol. 47, p. 102673, giu. 2022, doi: 10.1016/j.jwpe.2022.102673.
- [90] M.-T. I. I. all rights reserved, «Progettazione degli esperimenti (DoE)». Consultato: 10 gennaio 2024. [Online]. Disponibile su: https://www.mt.com/it/it/home/applications/L1_AutoChem_Applications/L2_ReactionAnalysis/design-of-experiments-doe.html
- [91] K. Duangkanya, A. Kopwitthaya, S. Chanhorm, e Y. Infahsaeng, «Oxygen plasma treatment time induced hydrophilicity of polydimethylsiloxane (PDMS) thin films for liquid lenses application», *Materials Today: Proceedings*, vol. 65, giu. 2022, doi: 10.1016/j.matpr.2022.06.121.
- [92] M. I. Butrón-García, J. A. Jofre-Reche, e J. M. Martín-Martínez, «Use of statistical design of experiments in the optimization of Ar–O₂ low-pressure plasma treatment conditions of polydimethylsiloxane (PDMS) for increasing polarity and adhesion, and inhibiting hydrophobic recovery», *Applied Surface Science*, vol. 332, pp. 1–11, mar. 2015, doi: 10.1016/j.apsusc.2015.01.144.
- [93] A. Zahid, B. Dai, R. Hong, e D. Zhang, «Optical properties study of silicone polymer PDMS substrate surfaces modified by plasma treatment», *Mater. Res. Express*, vol. 4, fasc. 10, p. 105301, ott. 2017, doi: 10.1088/2053-1591/aa8645.

- [94] R. L. Williams, D. J. Wilson, e N. P. Rhodes, «Stability of plasma-treated silicone rubber and its influence on the interfacial aspects of blood compatibility», *Biomaterials*, vol. 25, fasc. 19, pp. 4659–4673, ago. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.12.010.
- [95] L. Zhao, J. Lee, e P. Sen, «Long-term retention of hydrophilic behavior of plasma treated polydimethylsiloxane (PDMS) surfaces stored under water and Luria-Bertani broth», *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 181, pp. 33–42, lug. 2012, doi: 10.1016/j.sna.2012.04.038.
- [96] R. Leardi, C. Melzi, G. Polotti, *CAT (Chemometric Agile Tool)*, freely downloadable from <http://gruppochemiometria.it/index.php/software>.
- [97] «Interfasi: caratteristiche chimico-fisiche - Enciclopedia», Treccani. Consultato: 11 giugno 2024. [Online]. Disponibile su: [https://www.treccani.it/enciclopedia/interfasi-caratteristiche-chimico-fisiche_\(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica\)/](https://www.treccani.it/enciclopedia/interfasi-caratteristiche-chimico-fisiche_(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica)/)
- [98] «Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis | SpringerLink». Consultato: 18 giugno 2024. [Online]. Disponibile su: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-6676-9>
- [99] «IR-2016 Università degli Studi di Ferrara <https://www.unife.it/.../dispense-docente/IR-2016>».
- [100] S. Kaciulis, «Spettroscopia elettronica delle superfici», 2005, pp. 103–129.
- [101] Dr. Paolo Bollella, «Spettroscopia di Fotoemissione ai Raggi X (XPS)».
- [102] J. Lefebvre, F. Galli, C. L. Bianchi, G. S. Patience, e D. C. Boffito, «Experimental methods in chemical engineering: X-ray photoelectron spectroscopy-XPS», *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 97, fasc. 10, pp. 2588–2593, 2019, doi: 10.1002/cjce.23530.
- [103] «prova a trazione». [Online]. Disponibile su: https://mypoliuni.weebly.com/uploads/8/1/6/8/81687434/5._deformazione_plastica.pdf
- [104] «deformazione polimeri». [Online]. Disponibile su: Università Tor Vergata <https://didattica.uniroma2.it/files/scarica/insegnamento/17282>
- [105] M. Rafiei, J. T. Chung, e Y. Chau, «Roles of biomaterials in modulating the innate immune response in ocular therapy», *Front. Drug Deliv.*, vol. 3, feb. 2023, doi: 10.3389/fddev.2023.1077253.
- [106] A. Klapstova *et al.*, «A PVDF electrospun antifibrotic composite for use as a glaucoma drainage implant», *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 119, p. 111637, feb. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2020.111637.
- [107] TY - JOUR AU - Zhianmanesh, Masoud AU - Gilmour, Aaron AU - Bilek, Marcela AU - Akhavan, Behnam PY - 2023/06/01 SP - 021301 TI - Plasma surface functionalization: A comprehensive review of advances in the quest for bioinstructive materials and interfaces VL - 10 DO - 10.1063/5.0130829 JO - Applied Physics Reviews ER -
- [108] L. Broccardo, «Il disegno sperimentale», in *Chemoinformatica: Soluzioni e strumenti per scienze e tecnologie biomediche*, M. Mabilia, M. Bacilieri, A. Bassan, L. Broccardo, E. Fioravanzo, S. Moro, L. Sartori, e M. Stocchero, A c. di, Milano: Springer Milan, 2012, pp. 1–35. doi: 10.1007/978-88-470-2409-0_1.
- [109] *NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods*, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, 2024.
- [110] D. M. Correia *et al.*, «Surface wettability modification of poly(vinylidene fluoride) and copolymer films and membranes by plasma treatment», *Polymer*, vol. 169, feb. 2019, doi: 10.1016/j.polymer.2019.02.042.
- [111] M. Kitsara *et al.*, «Permanently hydrophilic, piezoelectric PVDF nanofibrous scaffolds promoting unaided electromechanical stimulation on osteoblasts», *Nanoscale*, vol. 11, fasc. 18, pp. 8906–8917, mag. 2019, doi: 10.1039/C8NR10384D.

- [112] D. M. Correia *et al.*, «Influence of oxygen plasma treatment parameters on poly(vinylidene fluoride) electrospun fiber mats wettability», *Progress in Organic Coatings*, vol. 85, pp. 151–158, ago. 2015, doi: 10.1016/j.porgcoat.2015.03.019.
- [113] «Materials | Free Full-Text | Study of Radio Frequency Plasma Treatment of PVDF Film Using Ar, O₂ and (Ar + O₂) Gases for Improved Polypyrrole Adhesion». Consultato: 3 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.mdpi.com/1996-1944/6/8/3482>
- [114] R. Kotsilkova *et al.*, «Tensile and Surface Mechanical Properties of Polyethersulphone (PES) and Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membranes», *Journal of Theoretical and Applied Mechanics*, vol. 48, pp. 85–99, set. 2018, doi: 10.2478/jtam-2018-0018.
- [115] V. Sencadas, S. Lanceros-Méndez, R. Sabater i Serra, A. Andrio Balado, e J. L. Gómez Ribelles, «Relaxation dynamics of poly(vinylidene fluoride) studied by dynamical mechanical measurements and dielectric spectroscopy», *Eur. Phys. J. E*, vol. 35, fasc. 5, p. 41, mag. 2012, doi: 10.1140/epje/i2012-12041-x.
- [116] J. Gomes, J. S. Nunes, V. Sencadas, e S. Lanceros-Mendez, «Influence of the β -phase content and degree of crystallinity on the piezo- and ferroelectric properties of poly(vinylidene fluoride)», *Smart Mater. Struct.*, vol. 19, fasc. 6, p. 065010, apr. 2010, doi: 10.1088/0964-1726/19/6/065010.
- [117] C. Sutthiwanjampa, S. Hong, W. J. Kim, S. H. Kang, e H. Park, «Hydrophilic Modification Strategies to Enhance the Surface Biocompatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Biomaterials for Medical Applications», *Advanced Materials Interfaces*, vol. 10, fasc. 12, p. 2202333, 2023, doi: 10.1002/admi.202202333.
- [118] «Controlled mud-crack patterning and self-organized cracking of polydimethylsiloxane elastomer surfaces | Scientific Reports». Consultato: 6 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.nature.com/articles/srep14787>
- [119] «TY - JOUR AU - Stafie, Nela AU - Stamatialis, Dimitrios AU - Wessling, Matthias PY - 2005/10/01 SP - 220 EP - 231 T1 - Effect of PDMS cross-linking degree on the permeation performance of PAN/PDMS composite nanofiltration membranes VL - 45 DO - 10.1016/j.seppur.2005.04.001 JO - Separation and Purification Technology ER - ».
- [120] «Shows FTIR spectrum for neat silicone rubber material | Download Scientific Diagram». Consultato: 6 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: https://www.researchgate.net/figure/Shows-FTIR-spectrum-for-neat-silicone-rubber-material_fig1_329599759