



**Università  
degli Studi  
di Ferrara**

**Dottorato di ricerca in  
Scienze biomediche e biotecnologiche**  
Ciclo XXXVI (DM 45/2013)

*Coordinatore Prof. Paolo Pinton*

**Aderenze addominali post-operatorie e  
predisposizione genetica in F13A1 e F13B:  
indicatori prognostici di genere e follow-up  
a 10 anni**

Settore Scientifico Disciplinare MED/18

**Dottoranda**

Dott.ssa Sibilla Maria Grazia

---

**Tutore**

Prof. Carcoforo Paolo

---

Anni 2020/2023

# INDICE

1. INTRODUZIONE .....	3
1.1 CLASSIFICAZIONE .....	4
1.2 QUADRO CLINICO E COMPLICANZE .....	6
2. EZIOPATOGENESI.....	9
2.1 PERITONEO .....	9
2.2 SISTEMA FIBRINOLITICO .....	10
2.3 RUOLO DEL FATTORE XIII.....	14
2.4 FATTORE XIII E POLIMORFISMI.....	20
2.5 CONDIZIONI CLINICHE LEGATE AL POLIMORFISMO .....	22
3. IPOTESI E SCOPI.....	24
4. MATERIALI E METODI.....	25
4.1 <i>Selezione dei pazienti</i> .....	25
4.2 <i>Genotipizzazione</i> .....	26
4.3 <i>Analisi statistica</i> .....	27
5. RISULTATI.....	27
5.1 <i>Disegno dello studio e caratteristiche della popolazione</i> .....	27
5.2 <i>Correlazione tra intervento chirurgico e rischio di sviluppare AA e/o occlusione intestinale</i> .....	31
5.3 <i>Correlazione tra LAP e occlusione intestinale (analisi di sopravvivenza correlata al genere)</i> .....	33
5.4 <i>SNPs del fattore XIII nell'intera coorte di pazienti e nei sottogruppi: calcolo degli OR</i> .....	35
5.5 <i>Analisi di sopravvivenza FXIII SNPs nell'intera coorte e nei sottogruppi: analisi singole</i> .....	37
5.6 <i>Analisi di sopravvivenza FXIII SNPs nell'intera coorte e nei sottogruppi: analisi combinate</i> .....	38
6 DISCUSSIONE.....	41
7 BIBLIOGRAFIA.....	46

## 1. INTRODUZIONE

Le aderenze addominali (AA) rappresentano una risposta comune dell'organismo ad un intervento chirurgico addominale, laparoscopico o laparotomico. Si tratta di tessuto fibrotico che si forma tra il peritoneo parietale e i visceri addominali e tra i visceri addominali stessi. In letteratura il tasso di incidenza della AA è di circa 66% [1].

Le aderenze nella chirurgia dell'addome possono portare a diverse complicazioni, come il dolore addominale occasionale o persistente, quadri di subocclusione o occlusione intestinale e nella donna, l'infertilità [2]. Queste manifestazioni, nel loro insieme, possono essere definite come la "sindrome aderenziale post-operatoria" e comportano un aumento significativo dei costi sanitari, oltre ad essere associate a un alto tasso di complicanze e mortalità. L'1% di tutti i pazienti è ricoverato in ospedale per il trattamento delle AA [3]. Le aderenze post-operatorie sono causa di occlusioni intestinali nel 65-75% [1] e rappresentano la principale causa di dolore pelvico cronico in circa il 40% dei casi. La chirurgia del colon-retto, in particolare, è considerata a rischio elevato nel determinare l'occlusione intestinale dovuta alle aderenze [2]. Inoltre, i pazienti con sindromi metaboliche come obesità, diabete, ipertensione e iperlipidemia hanno un rischio più elevato di svilupparle [4]. Sebbene le AA possano essere trattate mediante lisi delle aderenze o approcci più conservativi, il tasso di recidiva delle aderenze è ancora elevato e raggiunge il 53% nell'occlusione intestinale [5].

Ad oggi è ampiamente dimostrato che i principali meccanismi responsabili della formazione delle aderenze sono da ricercare all'interno degli normali processi di guarigione e riparazione delle ferite [6]. Dopo un intervento chirurgico, il tessuto lesionato avvia una complessa serie di processi volti a riparare e sostituire la lesione con tessuto cicatriziale per ripristinare le normali caratteristiche fisiologiche e meccaniche. I processi riparativi coinvolgono mediatori solubili (ad esempio citochine infiammatorie/fattori di crescita) e diversi sottoinsiemi cellulari inclusi neutrofili, macrofagi, fibroblasti e cellule staminali mesenchimali. Qualsiasi squilibrio o disturbo nei processi infiammatori e di migrazione cellulare, nei fattori della coagulazione, nel sistema di fibrinolisi, o le alterazioni nelle fasi di deposizione e rimodellamento della matrice, possono portare alla formazione di AA [7-8]. Inoltre, sesso, età, ormoni e

genetica incidendo sull'infiammazione, sulla coagulazione, sulla fibrinolisi e possono quindi modificare il rischio di insorgenza di AA [9].

La problematica delle aderenze è stata oggetto di discussione tra i chirurghi per lungo tempo. Nonostante numerosi tentativi di prevenirne la formazione utilizzando farmaci naturali e di sintesi, materiali barriera, l'efficacia di questi approcci rimane insoddisfacente. Pertanto, trattamenti per la AA hanno attirato ampia attenzione. Biomateriali anti-AA in varie forme fisiche sono l'approccio di ricerca più popolare negli ultimi anni. Sia i polimeri biocompatibili naturali che quelli sintetici hanno mostrato capacità anti-AA nei modelli animali[7].

Alcuni di essi sono stati approvati per applicazioni cliniche, come ad esempio Seprafilm e Adepto. Tuttavia, non si può ignorare che questi materiali non mostrano un'efficacia sufficiente per prevenire la formazione di AA a lungo termine comportano anche alcuni rischi per la sicurezza o effetti collaterali a lungo termine.

L'obiettivo di questo studio è identificare i fattori predisponenti alla sindrome aderenziale attraverso un'analisi eziopatologica e valutare le possibilità di prevenire questo fenomeno attraverso l'approccio genetico.

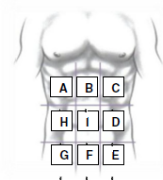
## **1.1 CLASSIFICAZIONE**

Le aderenze intraperitoneali possono essere suddivise in due categorie principali [10-11]: congenite, presenti sin dalla nascita a causa di anomalie nello sviluppo embrionale della cavità peritoneale e acquisite, che si sviluppano successivamente e sono categorizzate come infiammatorie o postchirurgiche. Le aderenze infiammatorie derivano da processi infiammatori all'interno dell'addome, come appendiciti, colecistiti, diverticoliti, malattia infiammatoria pelvica o l'uso di dispositivi contraccettivi intrauterini. Le aderenze post-chirurgiche costituiscono la maggior parte dei casi di aderenze intra-addominali.

La prima classificazione [12] fu proposta nel 1985 dall'AFS (American Fertility Society), considerando l'estensione, il tipo (velamentose o dense) e la localizzazione delle aderenze in relazione agli organi riproduttivi (ovaio destro e sinistro, tuba destro e sinistro). Nel 1990, Zhulke propose una classificazione delle aderenze in base al loro aspetto macroscopico che viene tuttora utilizzato ma non permette di quantificare quindi standardizzare analiticamente le aderenze [13].

Nel 2013 la World Society of Emergency Surgery (WSES) propose una classificazione delle aderenze, peritoneal adhesion index (PAI), basata sulle caratteristiche macroscopiche delle aderenze e la loro diffusione [14].

**PERITONEAL ADHESION INDEX:**



Regions:	Adhesion grade:	Adhesion grade score:
A Right upper	___	0 No adhesions
B Epigastrium	___	1 Filmy adhesions, blunt dissection
C Left upper	___	2 Strong adhesions, sharp dissection
D Left flank	___	3 Very strong vascularized adhesions, sharp dissection, damage hardly preventable
E Left lower	___	
F Pelvis	___	
G Right lower	___	
H Right flank	___	
I Central	___	
L Bowel to bowel	___	
<b>PAI</b>	<input type="text"/>	

Indice di adesione peritoneale: attribuisce a ciascuna zona dell'addome un punteggio relativo alle aderenze, la somma dei punteggi risulterà nel PAI [14].

Questo score risulta molto utile in campo chirurgico addominale, poichè vengono utilizzati criteri che riguardano il tipo e la gravità delle aderenze, la loro posizione, la loro estensione e la loro tenacia. Questi criteri sono adoperati per standardizzare le osservazioni e per valutare i risultati quando si esegue un secondo intervento chirurgico. E' utile valutare la qualità delle aderenze poiché possono essere utili anche per prevedere la complessità dell'adesiolisi (rimozione delle aderenze) e il potenziale impatto delle aderenze presenti al momento dell'operazione [15].

**-Tipo e severità delle aderenze correlabili con la potenziale patogenicità**

<b>Tipo I</b>	Velamentose e avascolari	Lieve
<b>Tipo II</b>	Spesse e avascolari	Moderato
<b>Tipo III</b>	Dense e vascolari	Severo
<b>Tipo IV</b>	Estese e conglutinate	Estremamente severo

Pertanto, è di vitale importanza condurre una valutazione preoperatoria basata sull'analisi della storia medica del paziente, sui sintomi e sulle precedenti procedure chirurgiche. La storia medica include il numero di interventi chirurgici addominali precedenti, la presenza di peritoniti pelviche o diffuse in passato e reinterventi a causa di complicanze settiche postoperatorie.

## **1.2 QUADRO CLINICO E COMPLICANZE**

Le aderenze post-chirurgiche sono un problema che colpisce milioni di persone in tutto il mondo, con la maggior parte dei casi che non manifesta sintomi evidenti. Solo nel 3-5% dei casi, queste aderenze causano problemi come ostruzioni intestinali, dolore cronico addominale e pelvico, e infertilità nelle donne. Dopo un intervento chirurgico addominale significativo, le aderenze intra-addominali sono quasi inevitabili, con oltre l'80% dei pazienti che sviluppa aderenze tra l'omento e la laparotomia e oltre il 50% dei pazienti che possono avere coinvolto l'intestino[16]. Le aderenze congenite e infiammatorie raramente portano a ostruzioni intestinali, tranne in casi di malrotazione intestinale, mentre le aderenze post-operatorie costituiscono più del 60% di tutte le ostruzioni dell'intestino tenue [17]. Queste aderenze iniziano a formarsi entro 72 ore dall'intervento chirurgico e diventano più resistenti e vascolarizzate entro 10-14 giorni. Di conseguenza, più del 20% delle ostruzioni intestinali da aderenze si verificano entro il primo mese dopo l'operazione e oltre il 40% entro il primo anno. Il follow-up a lungo termine rivela che circa il 5% dei pazienti che hanno subito una laparotomia svilupperà almeno un episodio di ostruzione intestinale da aderenze nel corso della loro vita, e tra questi, il 10-30% avrà ulteriori episodi [16]. L'incidenza di tali eventi aumenta con l'età del paziente, il numero di laparotomie e la complessità delle procedure chirurgiche, mentre il numero di episodi occlusivi precedenti rappresenta il miglior indicatore della probabilità di ricadute. Tuttavia, è importante notare che più dell'80% dei casi di ostruzione intestinale da aderenze possono essere trattati con successo mediante terapia medica conservativa, e un numero limitato di pazienti richiederà una nuova laparotomia [19]. Ne deriva quindi che, nonostante la percentuale di pazienti sottoposti a chirurgia addominale che sviluppa aderenze dopo l'intervento sia molto alta, soltanto pochi di questi svilupperà un quadro clinico e sintomatologico tale da dover subire un'ulteriore laparotomia.

Le aderenze post-chirurgiche hanno un impatto significativo sulla salute ginecologica, causando non solo dolore pelvico cronico, ma anche infertilità in circa il 15-20% delle donne e persino gravidanze ectopiche [20,22]. L'infertilità causata dalla sindrome aderenziale pelvica è spiegata dalla formazione di aderenze intorno alle ovaie e alle tube uterine, che possono intrappolare le ovaie e ostacolare il normale processo di crescita dei follicoli, nonché disturbare la motilità delle tube uterine, interferendo con il trasporto degli ovuli [20,21].

Questi fatti clinici sono supportati dalla scoperta che, dopo l'eliminazione chirurgica delle aderenze pelviche (adesiolisi), la percentuale di gravidanze nelle donne in precedenza infertili aumenta di circa il 40%, e nel 60-90% dei casi, il dolore pelvico cronico scompare [22].

Uno studio condotto da Sulaiman et al. [23] ha cercato di dimostrare questa teoria esaminando la distribuzione, la localizzazione, il diametro e il tipo di fibre presenti nelle aderenze peritoneali umane, sia associate al dolore pelvico cronico che non. Utilizzando tecniche istologiche e immunoistochimiche, hanno riscontrato la presenza di fibre in tutte le aderenze esaminate, che esprimevano la proteina associata al gene della calcitonina e la sostanza P. Questa ricerca ha suggerito che è il tessuto aderenziale stesso in grado di trasmettere il dolore dopo una stimolazione adeguata, confermando così il suo ruolo nella generazione del dolore cronico addominopelvico e la possibilità di alleviarlo attraverso l'adesiolisi.

Oltre a queste due importanti conseguenze, le aderenze comportano varie problematiche quando si rende necessario un intervento chirurgico successivo:

1. Il re-accesso attraverso una precedente incisione addominale può essere estremamente complicato e potenzialmente pericoloso per il paziente, richiedendo spesso una dissezione complicata delle aderenze intorno agli organi.
2. Aumenta notevolmente la durata dell'intervento chirurgico e il tempo di anestesia (l'esplorazione di un addome con aderenze richiede dai 15 minuti fino a 4 ore [24]).
3. L'adesiolisi (rimozione delle aderenze) espone a rischi intra-operatori come sanguinamenti, danni agli organi (come vescica, intestino, ureteri), fistole enterocutanee e, in alcuni casi, resezioni intestinali [25,26]. Studi recenti hanno rilevato un alto numero di lesioni intestinali non rilevate durante l'adesiolisi laparoscopica [24].

4. Il posizionamento del trocar durante la laparoscopia diventa difficile a causa delle aderenze o delle precedenti laparotomie, che sono state riscontrate in gran parte delle lesioni intestinali causate dai trocar.
5. C'è un aumento del 20% delle conversioni da laparoscopia a laparotomia in presenza di aderenze [24]. La presenza di aderenze e una storia di laparotomia sono fattori di rischio per tale conversione, come indicato da uno studio comparativo tra pazienti convertiti e non convertiti durante interventi di chirurgia ginecologica.
6. Le aderenze possono aumentare il rischio di infezione del sito chirurgico poiché la fibrina intraddominale è coinvolta nei meccanismi di difesa e può formare una rete adesiva che facilita l'eliminazione di batteri e particelle dalla cavità peritoneale. Tuttavia, questa stessa fibrina potrebbe anche proteggere i batteri dalle risposte infiammatorie, contribuendo così alle infezioni post-operatorie, che possono richiedere la riapertura o il drenaggio percutaneo di ascessi [24].
7. Queste complicazioni si traducono spesso in un prolungamento del periodo di degenza ospedaliera, con un impatto significativo sui costi sanitari. In alcuni paesi europei, i costi associati alle aderenze e alle relative complicazioni superano addirittura i costi dei trattamenti chirurgici per il cancro gastrico e del colon-retto [27].

La formazione di aderenze post-operatorie mostra una variabilità notevole tra i pazienti, che potrebbe dipendere non solo dall'entità delle aderenze, comune a tutti i pazienti sottoposti a laparotomia, ma anche dalla loro qualità. Per comprendere appieno la patogenesi e l'evoluzione della sindrome aderenziale post-chirurgica, è necessario concentrarsi sia su un livello cellulare che molecolare.



## **2. EZIOPATOGENESI**

Le aderenze post-chirurgiche si sviluppano in risposta a vari eventi, tra cui traumi, lesioni termiche, infezioni, ischemia e l'introduzione di corpi estranei. Questi eventi includono abrasioni dovute alla manipolazione, esposizione a sostanze estranee come il talco o fibre provenienti da garze o dispositivi emostatici, esposizione delle suture o del contenuto intestinale, e il riscaldamento eccessivo della cavità peritoneale dovuto all'uso di liquidi troppo caldi [9].

Per comprendere appieno la patogenesi e le diverse evoluzioni delle aderenze post-chirurgiche, è essenziale esaminare inizialmente la struttura e le funzioni del peritoneo, del sistema fibrinolitico e del fattore XIII.

### **2.1 PERITONEO**

Il peritoneo è un rivestimento che copre una vasta area del corpo e ha una ricca rete di vasi sanguigni. La sua superficie è costituita da cellule mesoteliali altamente specializzate, simili a quelle presenti nei rivestimenti pleurici e pericardici, che sono legate tra loro da legami estremamente deboli. Sotto queste cellule si trova una matrice extracellulare (ECM) composta da vari tipi di collagene, glicoproteine come la laminina e la fibronectina, glicosamminoglicani e proteoglicani, con cellule epiteliali non specializzate al di sotto di essa. Inoltre, una ricca rete di vasi sanguigni e linfatici si trova sotto questa matrice. Oltre a svolgere un ruolo di difesa immunitaria contro le infezioni e di fornire elasticità per permettere ai visceri addominali di muoversi liberamente senza attrito, il peritoneo ha una notevole capacità di dissolvere la fibrina e, per sua natura, tende a evitare la formazione di aderenze.

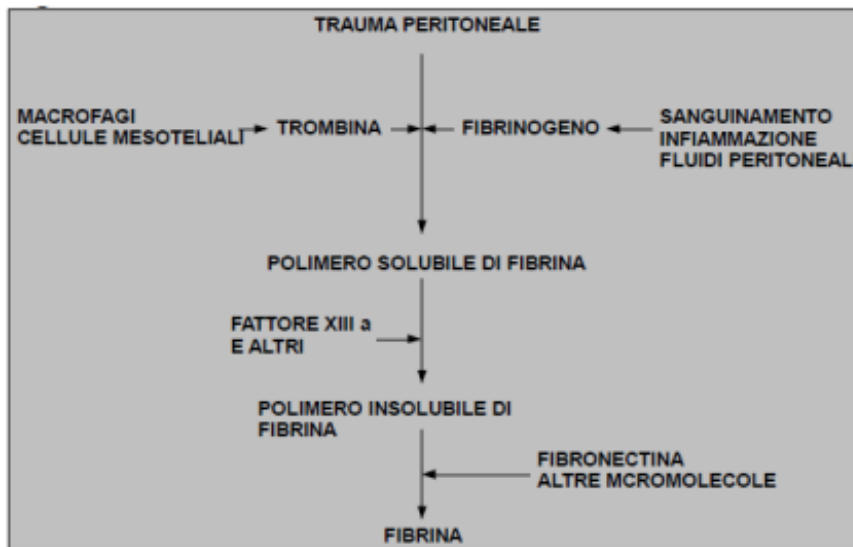
Le cellule mesoteliali sono debolmente ancorate alla membrana basale, il che le rende facilmente staccabili, anche in caso di traumi lievi. La diffusione e il riassorbimento dei fluidi avvengono liberamente attraverso il mesotelio e lo strato submesoteliale. Queste cellule, oltre a secernere sostanze come IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa e TGF-beta, possono contribuire al processo fibrinolitico rilasciando l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) e gli inibitori dell'attivatore del plasminogeno (PAI 1-2) [28-30]. Un aspetto distintivo del mesotelio è la sua capacità di rigenerare e ricoprire le superfici danneggiate con nuove cellule mesoteliali, che si sviluppano in piccole isole sulla

superficie danneggiata e proliferano rapidamente fino a ricoprire completamente l'area lesa, senza lasciare cicatrici. La riparazione non avviene dunque, come per le superfici epiteliali, progressivamente dall'esterno verso l'interno ma simultaneamente con formazione di un tappeto cellulare e ciò spiega perché la sua velocità non è strettamente legata all'estensione del peritoneo danneggiato e si svolge con grande rapidità (5-7 giorni per il peritoneo parietale e 5-8 giorni per quello viscerale indipendentemente dalle dimensioni) [31]

Un trauma chirurgico, una situazione di sofferenza ischemica o in generale un danno chimico-fisico (calore, essiccamento, compressione, radioterapia, chemioterapia endocavitaria), una contaminazione con materiali organici, corpi estranei, alterano il delicato equilibrio su cui il peritoneo basa la sua integrità e funzione. La lesione o l'infiammazione danno l'avvio nella fase iniziale alla riparazione, al rilascio di numerosi messaggeri chimici che portano ad una cascata di eventi nei quali i macrofagi peritoneali, i neutrofili, le cellule mesoteliali e la fibrina giocano il ruolo principale. In seguito all'intervento chirurgico aumentano e migrano in cavità addominale, i macrofagi attivati che cambiano funzione e liberano numerose sostanze tra cui: lipoossigenasi e ciclossigenasi, attivatore del plasminogeno e PAI, collagenasi, elastasi, IL 1 e 6, TNF e prostaglandine. Tali macrofagi inoltre formano piccole isole dalle quali poi parte la formazione di un tappeto di cellule mesoteliali che porterà alla completa riperitonealizzazione della lesione. La riparazione del peritoneo è caratterizzata quindi da meccanismi che portano all'adesiolisi spontanea o alla formazione di adesioni [30].

## **2.2 SISTEMA FIBRINOLITICO**

Nel processo di formazione delle aderenze, un ruolo di fondamentale importanza è svolto dall'organizzazione della matrice di gel fibrinico. Questa matrice si sviluppa in una serie di fasi: inizialmente, il fibrinogeno si trasforma in monomeri di fibrina, che successivamente si aggregano per formare polimeri di fibrina solubili. Durante l'intervento chirurgico e l'irrigazione dei tessuti, questi polimeri diventano insolubili, creando una matrice di fibrina in forma gelatinosa. Questo prodotto interagisce con diverse proteine, tra cui la fibronectina, per creare una matrice di fibrina con una struttura gelificata (Figura 1). I fibroblasti successivamente colonizzano questa matrice di fibrina e contribuiscono alla produzione della matrice extracellulare.



**Figura 1:** *Formazione della matrice di fibrina*

Questa matrice extracellulare può essere completamente smantellata grazie all'azione dei proenzimi delle metalloproteasi del tessuto, permettendo così una normale guarigione. Tuttavia, se questo processo viene bloccato dagli inibitori tissutali delle metalloproteasi, potrebbero formarsi le aderenze [32]. In generale, se il processo di fibrinolisi (la dissoluzione della fibrina) non avviene entro 5-7 giorni dalla lesione del peritoneo, la matrice di fibrina persiste e, gradualmente, diventa organizzata con la produzione di collagene da parte dei fibroblasti. Di conseguenza, quando due superfici peritoneali danneggiate, rivestite da questa matrice gelatinosa, entrano in contatto, possono formare un'aderenza, sia durante l'intervento chirurgico che nei successivi 3-5 giorni.

L'attività fibrinolitica nel peritoneo svolge un ruolo fondamentale nella patofisiologia della formazione delle aderenze post-chirurgiche. L'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) prodotto dalle cellule mesoteliali rappresenta una difesa naturale significativa contro la formazione di aderenze. La plasmina, un enzima, viene generata a partire dal suo precursor, il plasminogeno, grazie all'azione di due serine-proteasi: il tPA, che contribuisce per il 95%, e l'urochinasi (uPA), responsabile del restante 5%. Questi enzimi sono espressi dalle cellule endoteliali, mesoteliali e dai macrofagi. La principale funzione della plasmina è quella di degradare la matrice di fibrina gelificata in frammenti di fibrina (FDP), che perdono la capacità di formare aderenze. Nel sito di una lesione chirurgica o infiammatoria, il sistema di attivazione della plasmina, che contribuirebbe alla rimozione della fibrina dalla matrice gelificata, viene ostacolato

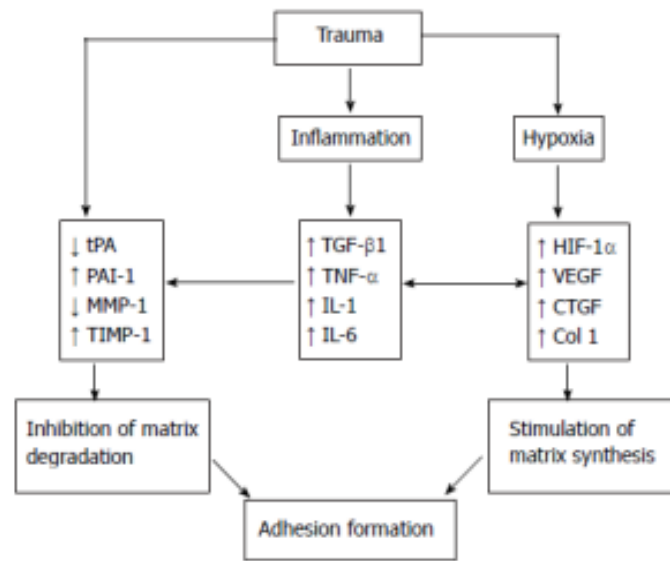
dalla presenza di due glicoproteine chiamate inibitori dell'attivazione del plasminogeno 1 e 2 (PAI 1-2). Questi inibitori agiscono bloccando sia l'azione del tPA che quella dell'uPA e svolgono un ruolo attivo nella regolazione della rimozione della fibrina dalla matrice gelificata. Le cellule endoteliali, i macrofagi e i fibroblasti sono le principali fonti di produzione di PAI 1 e PAI 2 [32]. È stato anche identificato un altro inibitore dell'attivatore del plasminogeno chiamato PAI3. Altri inibitori come l'alfa2-macroglobulina, l'alfa1-antitripsina e l'alfa2-antiplasmina agiscono direttamente sulla plasmina, ma il loro ruolo specifico nella fibrinolisi peritoneale non è ancora completamente chiarito.

Le aderenze fibriniche, che di solito si formano in seguito a una lesione del peritoneo, possono essere facilmente sciolte se la fibrinolisi locale è adeguata. Tuttavia, se la fibrinolisi risulta insufficiente, si verifica la formazione di tessuto connettivo, il che porta alla comparsa di aderenze stabili dopo un intervento chirurgico. Il bilancio tra il plasminogeno attivato e il plasminogeno inattivato svolge un ruolo cruciale nella determinazione di una normale guarigione o della formazione di aderenze. Pertanto, l'inibitore dell'attivazione del plasminogeno 1 (PAI1) è considerato un fattore importante nello sviluppo delle aderenze, e si è riscontrata una concentrazione elevata di PAI nelle aderenze e nel peritoneo dei pazienti affetti dalla sindrome viscerale adesiva [33,34].

Un'indagine condotta da Ivarsson et al. ha coinvolto la biopsia delle aderenze in pazienti sottoposti a laparotomia [10]. Questi pazienti presentavano aderenze di vari gradi e la severità delle aderenze è stata valutata durante l'intervento chirurgico. Nel confronto tra individui con aderenze di gravità moderata e quelli con aderenze gravi, quest'ultimi presentavano un'elevata espressione di PAI1 e una ridotta attività del tPA, non solo nei tessuti aderenziali, ma anche nel tessuto peritoneale adiacente al sito delle aderenze. Di conseguenza, esiste una forte correlazione tra uno stato di ipofibrinolisi, massimo entro le prime 72 ore dopo l'intervento [35,36], e l'aumento del numero di aderenze post-chirurgiche.

Le condizioni di ridotto apporto sanguigno e ossigenazione dei tessuti, spesso riscontrate durante un intervento chirurgico, contribuiscono alla diminuzione dell'attività fibrinolitica e all'aumento dell'espressione del fattore inducibile dall'ipossia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). Questo non solo favorisce la persistenza delle aderenze fibriniche, ma stimola anche lo sviluppo di aderenze fibrovascolari tramite fattori angiogenetici. Questo fenomeno è dovuto alle funzioni di HIF, tra cui la diminuzione del tPA e

l'aumento del PAI prodotto dai fibroblasti tissutali, l'aumento dell'espressione di TIMP-1 con conseguente riduzione della degradazione della matrice, l'inibizione dell'apoptosi dei fibroblasti, che aumenta la produzione di TGF- $\beta$  e collagene di tipo 1, e l'espressione di VEGF, promuovendo la neoangiogenesi (Figura 2). Le principali molecole aberranti connesse con la formazione delle aderenze sono quindi l'attivatore tissutale del plasminogeno (ridotto), TGF- $\beta$  (iperespresso) ed HIF-1 $\alpha$  (iperespresso).



**Figura 2.** Il ruolo del trauma, dell' ipossia e dell' infiammazione nella modulazione delle molecole interagenti nella formazione delle aderenze. tPA:attivatore tissutale del plasminogeno; PAI-1: inibitore 1 dell' attivatore del plasminogeno; MMP: Metalloproteasi della matrice; TGF- $\beta$ 1: Fattore di crescita trasformante; TNF- $\alpha$ : Fattore di crescita tumorale; IL: Interleuchine; HIF-1 $\alpha$ : Fattore indotto dall' ipossia; VEGF: Fattore di crescita dell' endotelio vascolare; CTGF:Fattore di crescita del tessuto connettivo.

Diversi sono i tempi in cui gli eventi che portano alla formazione di aderenze si svolgono a fronte di una fibrinolisi insufficiente e di altre componenti cellulari e proteiche che diventano predominanti:

#### -Temporizzazione della formazione delle aderenze

<b>1°-3° giorno</b>	Elementi cellulari sono inglobati in una matrice di fibrina: PMN e linfociti, ma anche macrofagi, eosinofili, eritrociti
<b>4° giorno</b>	I macrofagi predominano nelle maglie di fibrina – pochi fibroblasti
<b>5° giorno</b>	Sono evidenti distinte bande di collagene; i fibroblasti

	formano un sincizio
7° giorno	Collagene e fibroblasti sono la componente dominante dell'adesione
2° sett - 2° mese	Gli elementi cellulari dell'adesione sono sostituiti pressoché interamente dal collagene

### 2.3 RUOLO DEL FATTORE XIII

Il Fattore XIII (FXIII), noto anche come Fattore di Laki-Lorand, è una enzima protransglutaminasi che si trova nel plasma sanguigno sotto forma di un complesso eterotetramero, composto da due subunità A e due subunità B. La subunità A è anche presente come omodimero all'interno delle piastrine e dei macrofagi/monociti. Le subunità A (FXIII-A) con un peso molecolare di 83.2 kDa contengono il sito attivo cisteinico e vengono prodotte da epatociti, megacariociti e monociti. D'altra parte, le subunità B con un peso molecolare di 79.7 kDa (FXIII-B) svolgono il ruolo di proteine carrier e vengono sintetizzate come monomeri dal fegato.

La subunità A è suddivisa in quattro domini distinti: il dominio  $\beta$ -sandwich, il nucleo catalitico e i domini Barrel 1 e 2. Invece, la subunità B è una proteina modulatrice che comprende dieci domini chiamati domini Sushi. La sua principale funzione è quella di stabilizzare e trasportare la subunità A, che è idrofobica, nel circolo sanguigno umano.

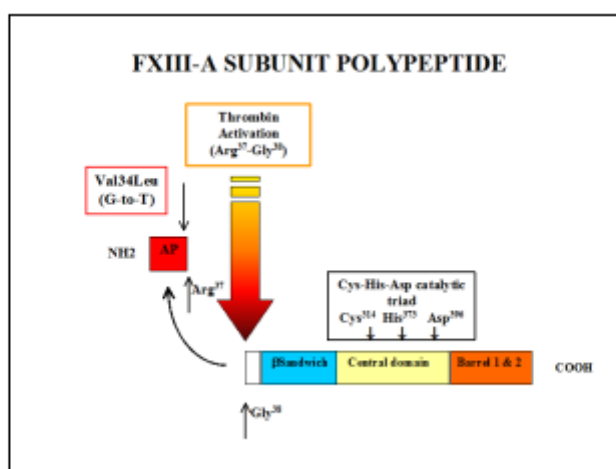


Figura 3. Taglio proteolitico del peptide di attivazione (AP) del FXIII-A da parte della trombina in posizione Arg<sup>37</sup>-Gly<sup>38</sup>

Il Fattore XIII (FXIII) viene attivato grazie all'azione della trombina, che taglia un legame peptidico tra l'Arg 37 e la Gly 38 nella subunità A. Questo processo rilascia un peptide di attivazione contenente 37 amminoacidi all'estremità ammino-terminale. Un elemento cruciale in questa fase di attivazione sono i polimeri di fibrina. La formazione di un complesso composto da trombina, polimeri di fibrina e FXIII accelera il processo di clivaggio della subunità A, con conseguenze significative per il sistema di coagulazione. Un aspetto importante è il rapporto tra il FXIII e il fibrinogeno, che di solito è di 1:100. Ciò significa che l'attivazione del FXIII inizia quando solo il 2% del fibrinogeno si è convertito in polimeri di fibrina. Di conseguenza, il FXIIIa inizia a stabilizzare i polimeri di fibrina prima che si possa osservare la formazione di un trombo visibile.

Il processo di attivazione del FXIII richiede la presenza di ioni calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) che sono essenziali per il distacco del dimero delle subunità A dal dimero delle subunità B. Questo distacco causa un cambiamento nella conformazione della proteina, che espone i siti attivi (Figura 3). Durante questo processo, le subunità B non rimangono legate al coagulo, lasciando dietro di sé solamente una rete di fibrina.

Il Fattore XIII attivato (FXIIIa) svolge un ruolo importante nella coagulazione del sangue catalizzando la formazione di legami tra le catene  $\gamma$  e  $\alpha$  all'interno dei polimeri di fibrina. Questi legami tra le catene  $\alpha$  contribuiscono a creare una sorta di barriera protettiva che impedisce alla plasmina di degradare la fibrina, preservando così l'integrità della struttura del coagulo. La plasmina è un enzima che ha la capacità di degradare la fibrina in frammenti solubili.

Inoltre, il FXIIIa incorpora all'interno del coagulo di fibrina, mediante legami simili, altre proteine, come la fibronectina e la trombospondina, che svolgono un ruolo nelle adesioni cellulari. Questo contribuisce a mantenere il coagulo stabile e a facilitare il processo di guarigione. Inoltre, il FXIIIa può legare anche proteine antifibrinolitiche come l' $\alpha$ -2-antiplasmina, che aiutano a inibire la degradazione della fibrina da parte della plasmina (Figura 4).

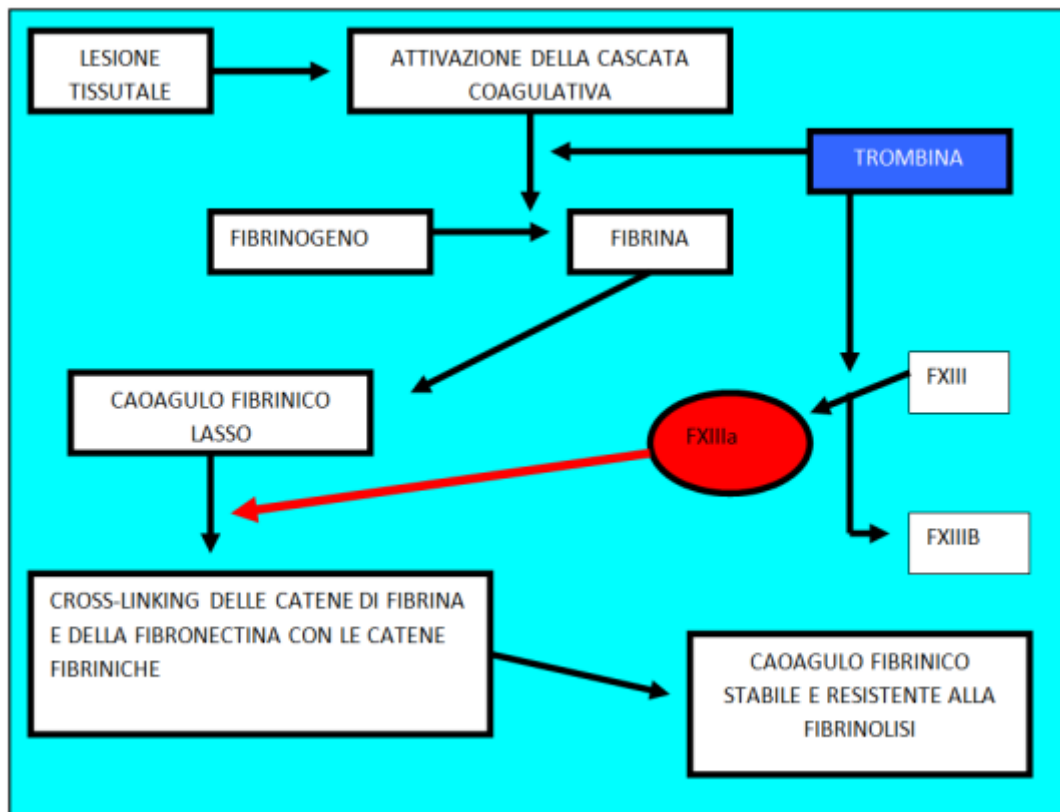


Figura 4. FXIII e stabilizzazione del coagulo di fibrina

L' $\alpha$ -2-antiplasmina, una volta legata in modo covalente alla fibrina, continua a svolgere un efficace ruolo di inibizione sulla plasmina. La fibronectina, una componente essenziale della struttura del tessuto connettivo e della membrana basale, assume una nuova funzione quando si lega alla fibrina tramite il Fattore XIII, simile al collagene [68,69]. Questa interazione modifica le caratteristiche meccaniche del coagulo e favorisce sia l'adesione che la migrazione delle cellule all'interno del coagulo.

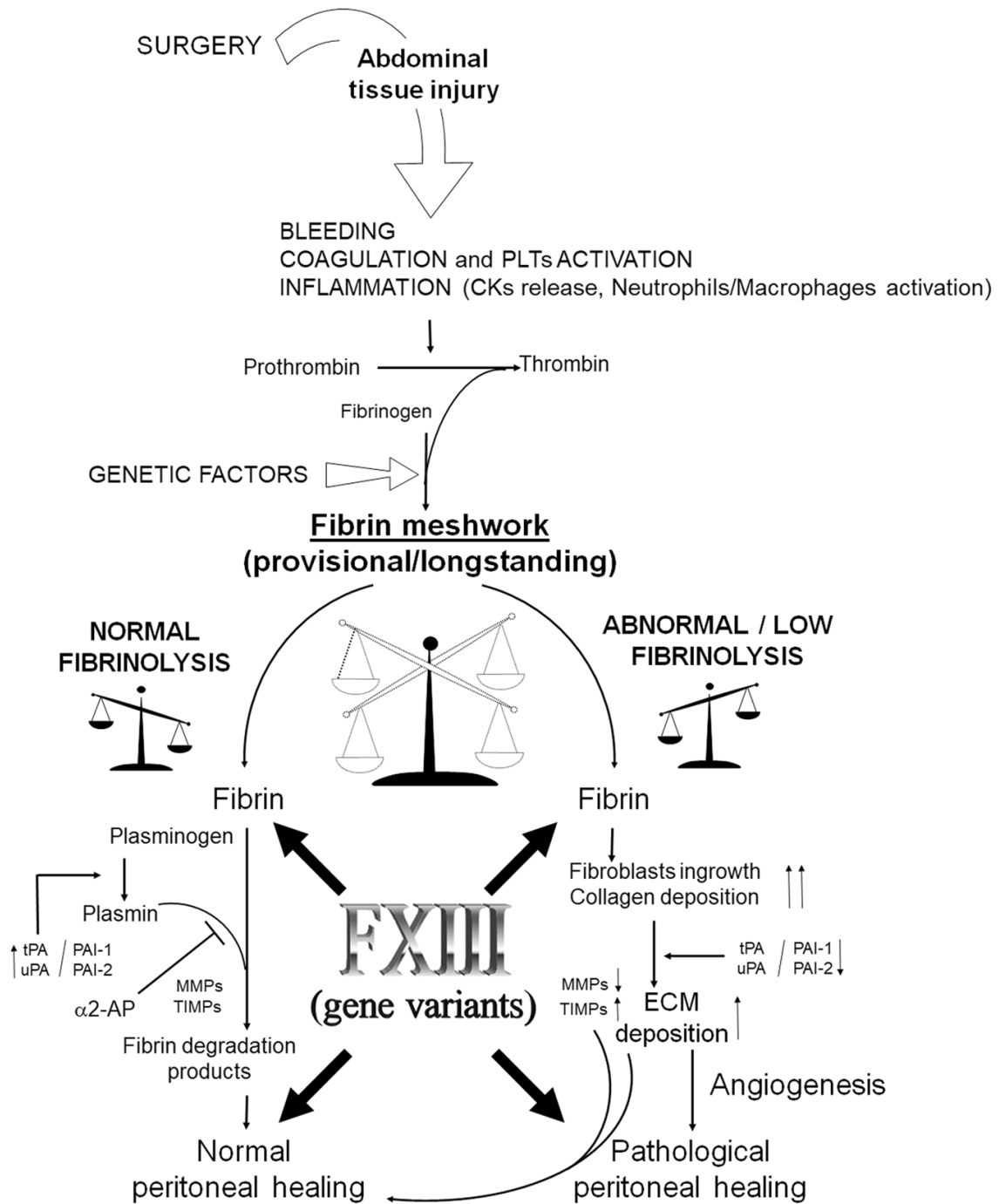
Inoltre, il collagene rappresenta un altro substrato del Fattore XIII. Durante un evento di danno vascolare, il collagene di diversi tipi (I, II, III e V) può legarsi alla fibronectina e, di conseguenza, alla fibrina. Questo processo contribuisce a stabilizzare la matrice extracellulare formata nella sede della lesione [37-41].

Il Fattore XIII ha anche altri substrati importanti tra cui gli inibitori della fibrinolisi (PAI), von Willebrand e il fattore V. Queste interazioni svolgono ruoli cruciali nel mantenere l'equilibrio nella coagulazione del sangue.



Questo processo ha come risultato principale il potenziamento della stabilità del coagulo di fibrina sia dal punto di vista chimico che meccanico, e contribuisce a rendere il coagulo più resistente alla fibrinolisi.

Studi recenti, come il lavoro condotto dal prof.Zamboni et al. nel 2004, hanno esaminato l'effetto del Fattore XIII in colture cellulari di fibroblasti del derma umano in presenza di metalloproteasi. Questi studi hanno dimostrato che il FXIII svolge un ruolo inibitorio sulle metalloproteasi (MMPs), contribuendo alla formazione di una matrice cellulare più resistente. Questo ha un impatto positivo sulla migrazione e la proliferazione dei fibroblasti, suggerendo che il Fattore XIII gioca un ruolo fondamentale nel processo di riparazione tissutale delle ferite. Ciò è stato confermato da un notevole miglioramento nel processo di guarigione delle ulcere venose quando il Fattore XIII è stato applicato in modo topico [42].



**Figura 5.** Rappresentazione schematica dell'interazione tra i fattori della coagulazione e infiammazione, coinvolta nella normale risoluzione della matrice di fibrina o lo sviluppo di aderenze addominali. CK, citochine; PLT, Piastrine; tPA, attivatore tissutale del plasminogeno; uPA, attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi; PAI-1 e PAI-2, plasminogeno inibitori attivatori 1 e 2; FXIII, Fattore XIII (A2B2);  $\alpha$ 2-AP, alfa 2-antiplasmina; MMP, Matrice Metalloproteinasi; TIMP, inibitori della metalloproteinasi tissutale.

Il Fattore XIII ha un ruolo anche nell'angiogenesi, che è il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni. L'emostasi e l'angiogenesi sono strettamente collegati. Dopo la formazione di un coagulo, il sistema di coagulazione e fibrinolisi contribuisce alla generazione di proteine coinvolte nell'angiogenesi.

Le proteine coinvolte nella coagulazione che promuovono l'angiogenesi includono la trombina, il fattore VII e il Fattore Tissutale. D'altro canto, ci sono proteine coinvolte nella coagulazione che agiscono in senso opposto, ovvero inibiscono l'angiogenesi, come l'antitrombina, u-PA, PAI1 e angiostatina.

Il Fattore XIII esplica il suo effetto proangiogenico promuovendo la migrazione, la proliferazione e inibendo l'apoptosi delle cellule endoteliali (che rivestono la superficie interna dei vasi sanguigni) attraverso la sua attività di transglutaminasi. Inoltre, il Fattore XIII riduce l'azione di una proteina antiangiogenetica chiamata TSP-1.

Il meccanismo coinvolge il legame del Fattore XIII all'integrina  $\alpha v \beta 3$  e al Fattore di crescita dell'endotelio vascolare VEGFR-2. Questo legame attiva il VEGFR-2, innescando una cascata di segnali che porta alla formazione di nuovi vasi sanguigni, ovvero all'angiogenesi [40].

È importante notare che il Fattore XIII ha un ruolo nell'immunità innata. Durante un'infezione, a livello del sito infetto, le proteine MASP-1 clivano il fibrinogeno e attivano il Fattore XIII, mentre le proteine MASP-2 attivano la protrombina. Queste proteine MASP svolgono un ruolo chiave nella promozione della deposizione e della polimerizzazione della fibrina sulla superficie dei microrganismi, limitando la loro diffusione nell'organismo. Il Fattore XIII è coinvolto nel processo di intrappolamento dei batteri come *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* nel coagulo di sangue. Questo avviene grazie alla formazione di legami covalenti tra le proteine presenti sulla superficie dei batteri e le fibre di fibrina. Questo processo è stato confermato tramite analisi di campioni di tessuto prelevati da pazienti con fascite necrotizzante da streptococco, sottolineando il ruolo della coagulazione come parte del sistema immunitario innato [41].

In sintesi, oltre al suo ruolo nella stabilizzazione del coagulo di fibrina, il Fattore XIII contribuisce al rimodellamento della matrice inibendo la degradazione proteolitica da parte delle metalloproteine (MMPs), ha un effetto antifibrinolitico, influisce sulla proliferazione e migrazione dei fibroblasti, contribuisce all'angiogenesi e partecipa alla risposta immunitaria innata (Figura 5) [40].

## 2.4 FATTORE XIII E POLIMORFISMI

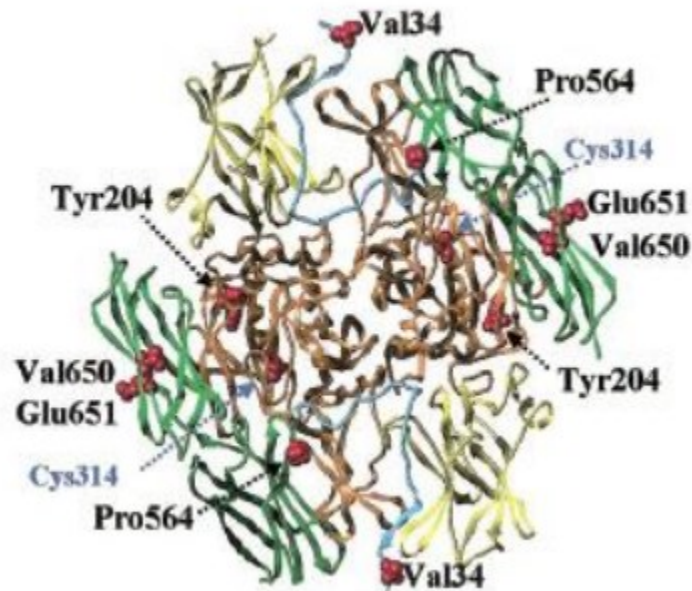
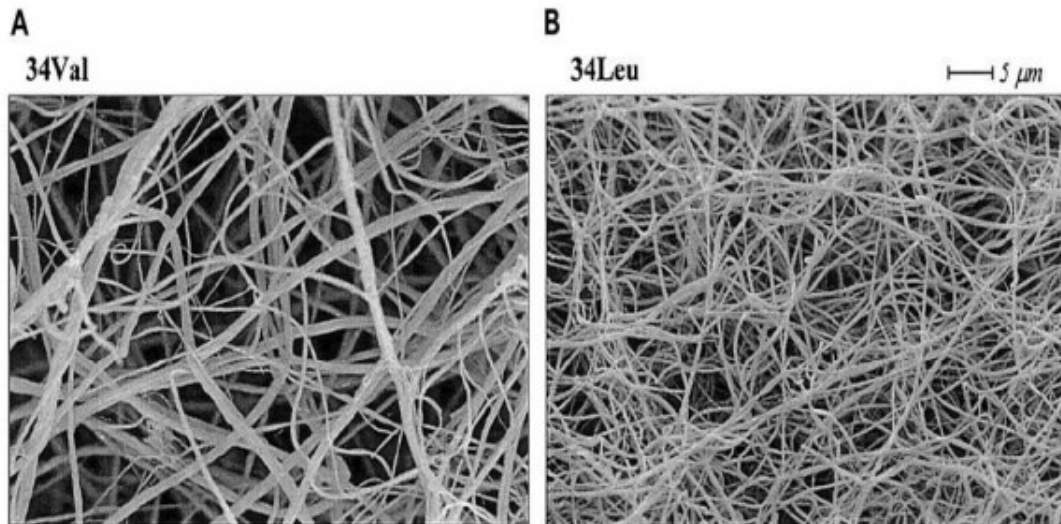


Figura 6. Struttura molecolare del Fattore XIII

Sono stati individuati tre polimorfismi comuni nella subunità A del Fattore XIII( figura 6):

1. Una mutazione G>T nel codone 34 della subunità A, che sostituisce la valina con una leucina. Questo polimorfismo, noto come Val34Leu, è piuttosto diffuso e ha una frequenza allelica compresa tra lo 0,25 e lo 0,30 nella popolazione di origine caucasica. La differenza tra questi due aminoacidi comporta una modifica nella funzione del Fattore XIII, che si riflette nell'alterazione della struttura molecolare dei legami crociati nella fibrina e nell'aumento della velocità con cui il Fattore XIII viene attivato dalla trombina. In particolare, l'attivazione del Fattore XIII con la leucina (FXIII<sup>Leu</sup>) da parte della trombina avviene più rapidamente rispetto a quella con la valina (FXIII<sup>Val</sup>). Studi condotti da Trubo e Maurer [43] hanno dimostrato che l'efficienza catalitica del sito di clivaggio della trombina è 5 volte maggiore nel Fattore XIII con la leucina rispetto a quello con la valina. Il polimorfismo Val34Leu ha un impatto sul processo di formazione della fibrina: i legami crociati promossi dal FXIII<sup>Leu</sup> si formano precocemente, determinando la formazione di fibre di fibrina più

sottili e inibendo il riarrangiamento molecolare e l'aggregazione laterale delle fibre. Di conseguenza, il coagulo di fibrina formato in presenza di Leu34 avrà fibre più sottili, pori più piccoli e una maggiore permeabilità [39].



2. Pro564leu: sostituzione in posizione 564 di una prolina con una leucina.
3. Tyr204Phe: la sostituzione di una tirosina in posizione 204 con una Fenilalanina. Avviene con una frequenza dallo 0,01 alle 0,03 ed è associata ad un aumentato rischio di aborti ricorrenti nella donna. [45]

Per quanto riguarda la subunità B, sono stati identificati tre distinti alleli. I polimorfismi in questa subunità sono stati inizialmente descritti da Board nel 1980, e successivamente vari altri gruppi di ricerca hanno condotto studi che hanno portato all'individuazione di tre polimorfismi.

Uno di questi polimorfismi, individuato da Komanasin e collaboratori, coinvolge una transizione da A a G nel codone 95, risultando nella sostituzione dell'aminoacido istidina con l'arginina nel secondo dominio Sushi della subunità B. Questo particolare polimorfismo ha una frequenza di circa 0,10. È interessante notare che questo polimorfismo influisce sul legame tra la subunità A e B, infatti, attraverso test di ELISA, è stato dimostrato che la frazione dissociata del complesso tetramero A2B2 aumenta nel plasma dei portatori di Arg95.

In sostanza, il polimorfismo Arg95 nella subunità B ha un impatto sul legame tra le subunità A e B del Fattore XIII, influenzando la struttura e la stabilità del complesso tetramero.

## 2.5 CONDIZIONI CLINICHE LEGATE AL POLIMORFISMO

1. Coronaropatia: Il Fattore XIIIa svolge un ruolo chiave nella formazione di legami crociati tra le molecole di fibrina, il che rende il trombo risultante più stabile e resistente. Questo suggerisce che il Fattore XIIIa potrebbe avere un'influenza nella patogenesi della malattia aterotrombotica, che coinvolge la formazione di coaguli nei vasi sanguigni. Diversi studi hanno esaminato la relazione tra il polimorfismo Val34Leu e il rischio di infarto miocardico (MI). Questi studi suggeriscono che la presenza della variante Leu, che comporta un aumento nella velocità di attivazione del Fattore XIII e una modifica nella struttura del coagulo di fibrina, potrebbe agire come un fattore protettivo contro l'insorgenza di MI. In particolare, Gemmati e colleghi hanno identificato il Fattore XIII L34-allele come un indicatore molecolare indipendente nella prognosi di eventi cardiaci avversi ricorrenti dopo un infarto miocardico acuto, senza avere un impatto significativo sul rischio di sanguinamento grave. Questo potrebbe essere dovuto alla precoce esaurimento della variante Leu del Fattore XIII.

È interessante notare che è stato individuato un effetto sinergico con il polimorfismo H95R nella riduzione di questo rischio. In sintesi, il Fattore XIII con il polimorfismo Val34Leu sembra avere un'influenza positiva nella prevenzione di eventi cardiaci avversi dopo un infarto miocardico [46].

2. Disordini trombotici venosi: sono stati condotti sei studi per esaminare la relazione tra il polimorfismo Val34Leu del Fattore XIII e la trombosi venosa [47]. Tra questi, tre hanno riportato una connessione protettiva simile a quella riscontrata per l'infarto miocardico, mentre gli altri tre non hanno evidenziato alcuna associazione.

Gemmati et al. ha dimostrato che l'allele Leu34 è coinvolto nella riduzione del tempo necessario per la guarigione delle ulcere venose dopo un intervento chirurgico di correzione emodinamica. Tuttavia, il Fattore XIII con la variante

Leu34 è risultato essere protettivo solo quando l'ulcera aveva raggiunto dimensioni considerevoli. Si potrebbe ipotizzare che l'azione positiva di questa variante sulle ulcere sia correlata al fatto che il polimorfismo aumenta l'attività del Fattore XIII. Questo aumento di attività si traduce in un'inibizione della degradazione da parte delle metalloproteasi, promuove la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti e stimola la formazione di nuovi vasi sanguigni (neoangiogenesi). Tutte queste azioni contribuiscono a un miglioramento della guarigione della ferita e a tempi di recupero più brevi [47,48].

Al contrario, la presenza del Fattore XIII con il polimorfismo Val34Val è associata a un peggior esito e a un tempo di guarigione più prolungato delle ulcere. Inoltre, i pazienti con questa variante mostrano una maggiore estensione della superficie delle ulcere.

3. Malattia cerebrovascolare: Gemmati e colleghi hanno rilevato che l'allele Leu34 è notevolmente più frequente nei soggetti affetti da Emorragia Intracranica Primaria, mentre risulta essere meno comune nei pazienti con malattie cerebrovascolari e coronaropatia. Di conseguenza, questo polimorfismo costituisce un fattore di rischio per le emorragie, ma al contempo rappresenta una forma di protezione nei confronti della trombosi arteriosa e venosa cerebrale [49].
4. Rigenerazione assonale: Hitomi e i suoi colleghi, studiando l'occhio dei pesci, hanno scoperto che il Fattore XIII è prodotto da astrociti e cellule della microglia nel nervo ottico in seguito a una lesione nervosa. In questo contesto, il Fattore XIII viene iperprodotto, e vale la pena notare che un aumento temporaneo nelle cellule gangliari della retina favorisce la crescita dei nervi, mentre un aumento prolungato nel nervo ottico promuove l'allungamento grazie alla rigenerazione delle fibre nervose [50].
5. Occhio: È stata identificata un'associazione tra l'allele Leu34 e l'emorragia subcongiuntivale spontanea (SCH). Secondo gli studi condotti dal prof. Parmeggiani e colleghi, sia la forma eterozigote che quella omozigote di questo polimorfismo predispongono a episodi di emorragie congiuntivali spontanee e ricorrenti [51].

6. Terapia: Parmeggiani e il suo team hanno dimostrato che un polimorfismo specifico del Fattore XIIIa (nello specifico il G185T) influisce sulla risposta dei pazienti affetti da Neovascolarizzazione coroidale (CNV) alla terapia Fotodinamica. La CNV è una complicazione della degenerazione maculare che comporta la formazione di nuovi vasi sanguigni nella coroide, spesso associati a sanguinamenti. Questa condizione può essere causata dall'invecchiamento o dalla miopia patologica.

Il trattamento standard per la CNV prevede l'uso di terapia Fotodinamica con verdeporfina (PDT-V) e farmaci anti-VEGF. Tuttavia, è emerso che la presenza di questa variazione nella subunità A del Fattore XIII migliora la capacità di risposta dei pazienti alla terapia Fotodinamica. Questi risultati suggeriscono che l'identificazione di questa variazione genetica potrebbe permettere di selezionare con maggiore precisione i pazienti che trarranno il massimo beneficio dalla terapia, migliorando così l'efficacia del trattamento e riducendo i costi sanitari complessivi.

### **3. IPOTESI E SCOPI**

L'analisi della fisiopatologia delle aderenze ha rivelato l'importanza di tre elementi chiave nel processo: il peritoneo, noto per la sua capacità di rigenerazione unica, il sistema fibrinolitico, influenzato dalla chirurgia, e il FXIII, che stabilizza la struttura delle aderenze infiammatorie e post-chirurgiche. Tra questi fattori, il FXIII, come abbiamo precedentemente osservato, mostra la maggiore variabilità genetica nella popolazione generale. Inoltre, esistono varianti genetiche di FXIII che lo rendono più adatto a creare legami tra il collagene e altre proteine della matrice, piuttosto che a formare solo polimeri di fibrina. La nostra teoria è che queste varianti genetiche possano contribuire a creare aderenze più resistenti, facilitando così la formazione di aderenze sintomatiche o, in alcuni casi, occlusive.

L'obiettivo di questo studio è confermare questa ipotesi mediante un disegno di studio caso-controllo che confronta la frequenza allelica di tali varianti tra individui sottoposti ad intervento chirurgico che si presentano con aderenze occlusive, aderenze



asintomatico e individui privi di aderenze, che sono omogenei per età e sesso. Abbiamo inoltre effettuato un follow up clinico di 10 anni.

## **4. MATERIALI E METODI**

### ***4.1 Selezione dei pazienti***

Lo studio ha coinvolto complessivamente 426 pazienti sottoposti a diverse tipologie di interventi chirurgici addominali (LAP), laparotomici o laparoscopici, presso il Dipartimento Chirurgico della Azienda Ospedaliero Universitaria di Ferrara, nel periodo da gennaio 2012 a dicembre 2013. Lo studio è stato condotto in conformità alla Dichiarazione di Helsinki e con l'approvazione del Comitato Etico Locale di Ferrara; è stato ottenuto il consenso informato firmato da tutti i pazienti. Sono stati inclusi diversi interventi di chirurgia colo-rettale (n = 151; ♀, n = 67 e ♂, n = 84); appendicectomia (n = 123; ♀, n = 72 e ♂, n = 51); altri interventi addominali (splenectomia e colecistectomia n = 93; ♀, n = 37 e ♂, n = 56); isterectomia (n = 59). Lo scopo era includere pazienti che in anamnesi presentavano un pregresso intervento chirurgico addominale e che fossero stati ricoverati per occlusione intestinale da verosimile sindrome aderenziale o che contrariamente, non presentavano alcun sintomo correlato. Le AA nella seconda LAP sono state valutate secondo la classificazione del Gruppo di Valutazione delle Aderenze [52]. La valutazione clinica dei pazienti senza complicazioni dopo la precedente LAP includeva la storia del paziente, l'esame fisico dell'addome, la qualità della cicatrice, la presenza di ernia laparotomica e la valutazione della peristalsi nei diversi quadranti addominali mediante ecografia (Esaote My Lab 70, sonda convessa da 3,5 MHz, Genova, Italia). Il prelievo di sangue è stato eseguito solo dopo la firma del consenso informato e anonimizzato per condurre analisi del genotipo in cieco.

Nessuno dei pazienti arruolati è stato trattato con barriere anti-adesione in alcuna forma (membrane solide, gel, liquidi o spray), e l'unica procedura applicata consistente in un'ampia lavaggio con soluzione fisiologica salina. Per questo studio, i pazienti selezionati sono stati richiamati per una visita di follow-up dopo 10 anni per valutare lo stato clinico e se fossero stati sottoposti ad ulteriori laparotomie.

La coorte dei pazienti è stata divisa come segue:

1. Gruppo A (n=212) includeva pazienti con AA riscontrate durante intervento chirurgico. Di questi, 117 sono stati operati per un quadro di OCCLUSIONE INTESTINALE da AA sviluppate entro 10 anni dalla prima LAP (sottogruppo A1) e 95 portatori di AA non sintomatiche occasionalmente rilevate durante una seconda LAP eseguita in elezione senza limiti di tempo dalla LAP originale (sottogruppo A2).
2. Gruppo B (n=214) includeva pazienti senza AA. Centoquattordici pazienti non presentavano AA durante il secondo intervento chirurgico addominale avvenuto almeno 10 anni dopo la prima LAP (sottogruppo B1) e 100 pazienti che non hanno avuto sintomi di dolore addominale, coliche e/o disturbi digestivi dopo il primo intervento addominale per un periodo di almeno 10 anni (sottogruppo B2).

I criteri di esclusione erano la presenza di cancro, malattie autoimmuni, complicanze infettive post-chirurgiche o qualsiasi altra causa che influenzasse la normale guarigione post-chirurgica.

#### ***4.2 Genotipizzazione***

Il sangue venoso intero è stato prelevato dai pazienti, raccolto in tubi Vacutainer con citrato di sodio e immediatamente congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'estrazione e purificazione del DNA (sistema BioRobot EZ1 QIAGEN; Hilden, Germania), l'amplificazione tramite PCR (Sure Cyclyer 8800; Agilent Technologies) e la genotipizzazione mediante pirosequenziamento (PyroMark Q96 ID, Qiagen) sono stati eseguiti in conformità con i nostri precedenti rapporti [53-57]. Tutte le oligosequenze degli SNP indagati (primer Forward, Reverse e Sequence) sono state selezionate per avere almeno il 98,0% di compatibilità. In base alle nostre procedure interne di controllo di qualità, abbiamo confermato gli aplogruppi re-genotipando circa il 20% di campioni selezionati casualmente tra ciascun genotipo diverso per ciascuno specifico SNP mediante analisi di restrizione enzimatica [57,58]. Non ci sono state discrepanze tra i genotipi rilevati in duplicato e/o mediante metodi diversi. I genotipi conosciuti sono stati utilizzati come riferimenti di controllo interno.

### ***4.3 Analisi statistica***

Le differenze statistiche tra i gruppi sono state valutate mediante il test del Chi-quadro e il test t di Student per la distribuzione dei genotipi e per le comparazioni dei valori medi  $\pm$  deviazione standard (SD), rispettivamente. La correzione di Yates o il test esatto di Fisher sono stati applicati quando appropriato. Il rapporto di probabilità (OR) e l'intervallo di confidenza al 95% (95% CI) sono stati utilizzati per stimare il rischio associato alle diverse LAP o SNP. Gli OR e i valori di p sono stati calcolati confrontando i sottogruppi per tutti i modelli genetici, compresa la distribuzione allelica. Nel caso in cui zeri causassero problemi con il calcolo del rapporto di probabilità (OR) o dell'errore standard, è stata utilizzata una formula di approssimazione aggiungendo 0,5 a ciascuna cella nella tabella di contingenza, come precedentemente riportato. Le curve di sopravvivenza sono state costruite mediante il metodo di Kaplan-Meier e la sopravvivenza libera da eventi (EFS) tra i gruppi è stata confrontata utilizzando il test Log-Rank. Per stimare il rischio di avere un esito clinico sfavorevole in termini di AA o occlusione intestinale, il rischio hazard (HR) e l'intervallo di confidenza al 95% (95% CI) sono stati calcolati tra le diverse LAP e le classi di genotipi mediante modellazione delle proporzioni di Cox. I valori di  $p \leq 0,05$  sono stati considerati significativi. La deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg è stata calcolata per ciascun polimorfismo nei gruppi e nei sottogruppi. Le analisi sono state eseguite utilizzando il pacchetto statistico SPSS (Versione 22; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e il software Statistica (Versione 13.3).

## **5. RISULTATI**

### ***5.1 Disegno dello studio e caratteristiche della popolazione***

La figura 7 presenta l'insieme dei pazienti arruolati che avevano precedentemente subito un intervento chirurgico laparotomico o laparoscopico (LAP). Il Gruppo A includeva pazienti che avevano sviluppato un'occlusione intestinale (sottogruppo A1) e pazienti con aderenze addominali occasionalmente rilevate durante un intervento chirurgico

eseguito per un' altra causa (sottogruppo A2). Il Gruppo B comprendeva pazienti senza aderenze addominali, confermate durante una seconda LAP (sottogruppo B1), e pazienti privi di sintomi indicativi di aderenze addominali (sottogruppo B2).

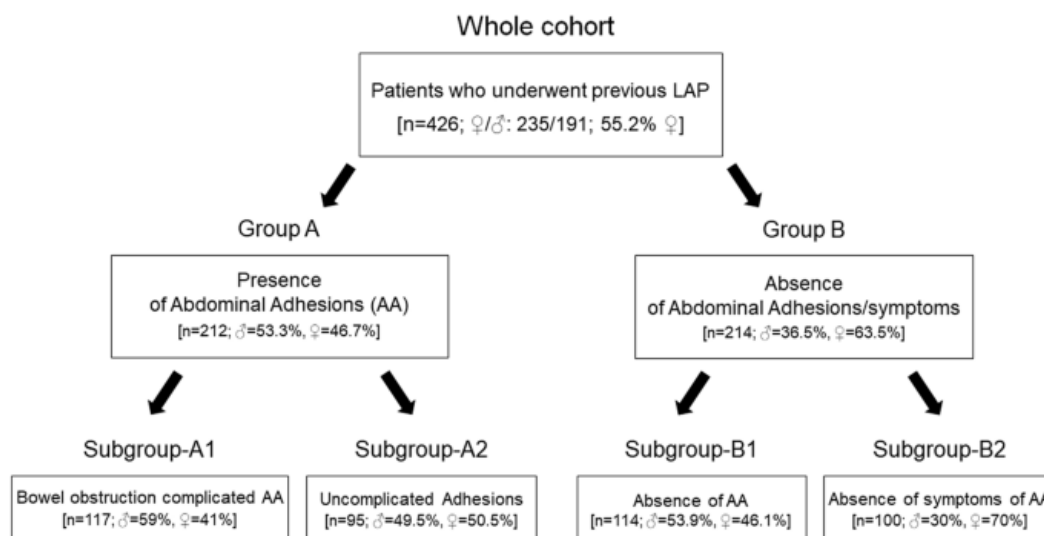


Diagramma di flusso dello studio. L'immagine mostra l'intero gruppo di pazienti arruolati sottoposti ad un precedente intervento chirurgico di LAP e la stratificazione dei sottogruppi in base al fenotipo clinico.

Figura 7.

Sebbene nell'intero gruppo di pazienti le donne fossero leggermente sovrarappresentate (55,2%), erano significativamente sottorappresentate tra coloro che avevano sperimentato AA (46,7% vs 63,5% rispettivamente nel gruppo A e nel gruppo B;  $P = 0,0005$ ).

La Tabella 1 illustra le principali caratteristiche cliniche ed epidemiologiche della popolazione di pazienti e le principali LAP presenti in anamnesi dei pazienti nei 10 anni precedenti. Il Gruppo A, che presentava aderenze addominali (AA), ha mostrato un'età media più elevata ( $P = 0,007$ ), un numero maggiore di interventi chirurgici al colon ( $P = 0,0001$ ), e un numero inferiore di appendicectomie ( $P = 0,0001$ ) e altri interventi chirurgici ( $P = 0,029$ ) rispetto al Gruppo B di controllo. Nella nostra coorte di pazienti, i maschi sembravano sviluppare più frequentemente le AA (Gruppo A). In particolare, i maschi con precedente chirurgia colo-rettale o appendicectomia non hanno raggiunto una sovrarappresentazione significativa rispetto alle femmine, mentre i maschi con precedente colecistectomia o splenectomia (altro intervento chirurgico) hanno superato significativamente le femmine ( $P = 0,04$ ). Infine, le donne con precedente isterectomia

sono raddoppiate nel sottogruppo B rispetto al sottogruppo A, anche se in misura non significativa.

**Tabella 1:**

Characteristics	Whole group (n = 426) [♀/♂, 235/191; 55.2% ♀]		P
	Group A (n = 212)	Group B (n = 214)	
Female sex (n; %)	99 (46.7)	136 (63.5)	<b>0.0005</b>
Age, years (mean ± SD)	69.76 ± 14.0	65.8 ± 15.5	<b>0.007</b>
<b>Original LAP (n)</b>			
<i>colon surgery (n = 151)</i>	112 (74.2)	39 (25.8)	<b>0.0001</b>
♀, n = 67 (%)	47 (70.1)	20 (29.8)	0.313
♂, n = 84 (%)	65 (77.4)	19 (22.6)	
<i>appendectomy (n = 123)</i>	43 (34.9)	80 (65.0)	<b>0.0001</b>
♀, n = 72 (%)	22 (30.5)	50 (69.4)	0.223
♂, n = 51 (%)	21 (41.2)	30 (58.8)	
<i>other surgery: splenectomy, cholecystectomy (n = 93)</i>	37 (39.8)	56 (60.2)	<b>0.029</b>
♀, n = 37 (%)	10 (27.0)	27 (73.0)	<b>0.040</b>
♂, n = 56 (%)	27 (48.2)	29 (51.8)	
<i>hysterectomy*, n = 59 (%)</i>	20 (33.9)	39 (66.1)	0.13

*I valori di P sono evidenziati in grassetto. Nelle analisi sono state calcolate solo le donne.*

La tabella 2 confronta i pazienti con AA che hanno sviluppato un'ostruzione intestinale dopo la precedente LAP (sottogruppo A1) rispetto a quelli con AA non complicate (sottogruppo A2) e i pazienti che non hanno sviluppato AA dopo la precedente LAP (sottogruppo B1) rispetto ai casi senza evidenza di sintomi relativi ad AA (sottogruppo B2).

**Tabella 2:**

Characteristics	Whole group (n = 426) [♀/♂, 235/191; 55.2% ♀]				P A1 vs A2	P B1 vs B2
	Group A (n = 212)		Group B (n = 214)			
	A1 (n = 117)	A2 (n = 95)	B1 (n = 114)	B2 (n = 100)		
Female sex (n; %)	49 (41.9)	50 (52.6)	65 (57.0)	71 (71)	n.s.	<b>0.034</b>
Age, years (mean ± SD)	68.9 ± 15.3	70.8 ± 12.2	68.7 ± 13.9	62.5 ± 16.5	n.s.	<b>0.002</b>
<b>Original LAP</b>						
colon surgery (n = 151)	69 (59)	43 (45.2)	28 (24.5)	11 (11)	<b>&lt;0.0001</b>	
♀, n = 67 (%)	28 (41.8)	19 (28.3)	13 (19.4)	7 (10.4)	n.s.	n.s.
♂, n = 84 (%)	41 (48.8)	24 (28.6)	15 (17.8)	4 (4.8)		
appendectomy (n = 123)	22 (18.8)	21 (22.2)	42 (36.8)	38 (38)	<b>0.0014</b>	
♀, n = 72 (%)	7 (9.7)	15 (20.8)	24 (33.3)	26 (36.1)	<b>0.01</b>	n.s.
♂, n = 51 (%)	15 (29.4)	6 (11.8)	18 (35.3)	12 (23.5)		
other surgery: splenectomy, cholecystectomy (n = 93)	15 (12.8)	22 (23.2)	29 (25.4)	27 (27)	<b>0.044</b>	
♀, n = 37 (%)	3 (8.1)	7 (18.9)	13 (35.1)	14 (37.8)	n.s.	n.s.
♂, n = 56 (%)	12 (21.4)	15 (26.8)	16 (28.6)	13 (23.2)		
hysterectomy*, n = 59 (%)	11 (18.6)	9 (15.2)	15 (25.4)	24 (40.8)	n.s.	n.s.
Years from first and second LAP (mean ± SD)	5.9 ± 8.5	9.66 ± 9.5	n.a.	n.a.	<b>0.025</b>	—

*I valori P significativi sono mostrati in grassetto. Nell'analisi sono state calcolate solo le donne.*

Le donne erano significativamente più numerose nel sottogruppo B2 rispetto a B1 (P = 0,034), e B2 presentava un'età media inferiore (P = 0,002) rispetto a B1. Al contrario, non sono state osservate differenze di sesso o età tra i sottogruppi A1 e A2.

La chirurgia del colon risultava essere più frequente nel sottogruppo A1 rispetto agli altri sottogruppi A2, B1, B2 (P <0,0001), senza differenze evidenti in una sottoanalisi stratificata per sesso. Questo suggerisce una stretta associazione tra la chirurgia del colon e la comparsa di aderenze addominali, indipendentemente dal genere. Al contrario, l'appendicectomia era più frequente nei sottogruppi B1 e B2 (P = 0,0014), con differenze significative soprattutto in una sottoanalisi stratificata per sesso, particolarmente evidente confrontando A1 vs A2 (P = 0,01). La colecistectomia e la splenectomia erano equamente distribuite tra i sottogruppi, e sebbene si osservasse una leggera sottorappresentazione nel sottogruppo A1 (P = 0,044), non si notavano differenze significative tra i sessi. Infine, l'isterectomia non mostrava differenze significative né nei confronti A1 vs A2 né nei confronti B1 vs B2.

È interessante notare che il tempo medio tra la prima LAP e la manifestazione di aderenze addominali è risultato significativamente più breve in coloro che hanno sviluppato un'occlusione intestinale (sottogruppo A1) rispetto a coloro (sottogruppo A2) in cui le aderenze addominali sono state casualmente rilevate durante un secondo

intervento chirurgico eseguito per altra causa ( $5,9 \pm 8,5$  anni vs  $9,66 \pm 9,5$  anni rispettivamente;  $P = 0,025$ ).

### ***5.2 correlazione tra intervento chirurgico e rischio di sviluppare AA e/o occlusione intestinale***

La Tabella 3 evidenzia il rischio di sviluppare aderenze addominali (gruppo A) o ostruzione intestinale correlata (sottogruppo A1) al tipo di LAP primaria eseguita. La chirurgia del colon ha mostrato il più alto tasso di sviluppo di aderenze nell'intero gruppo, quasi il 75%, comportando un aumento del rischio di 5,0 volte, con le donne che presentavano punteggi leggermente superiori rispetto agli uomini. L'appendicectomia e gli altri tipi di LAP considerati (colecistectomia, splenectomia o isterectomia) non hanno mostrato un rischio elevato di sviluppare aderenze, come indicato dal fatto che nessuna probabilità ha prodotto tassi superiori all'unità nell'intero confronto (gruppi A vs B), nella sottoanalisi (sottogruppi A1 vs B1) o nel sottogruppo di genere.

È interessante notare che, confrontando solo i casi che hanno sviluppato un'occlusione intestinale (sottogruppo A1) con quelli che non l'hanno sviluppata (sottogruppo B1), si è evidenziato un divario tra maschi e femmine, con le donne che presentavano un rischio 1,55 volte superiore rispetto agli uomini (OR = 5,33; IC del 95%: 2,32-12,23 e 3,44; IC del 95%: 1,58-7,49, rispettivamente).

A causa della chiara prevalenza della chirurgia del colon nella formazione di aderenze e al fine di rivelare eventuali associazioni di aderenze con altri tipi di LAP, abbiamo escluso la chirurgia del colon dai calcoli. Tuttavia, non si è ottenuto alcun miglioramento significativo nei valori OR, con l'unica eccezione dell'isterectomia, che ha progressivamente aumentato i valori OR da 0,63 (A vs B) fino a 2,71 (A1 vs B1) dopo l'esclusione dell'intervento chirurgico al colon.

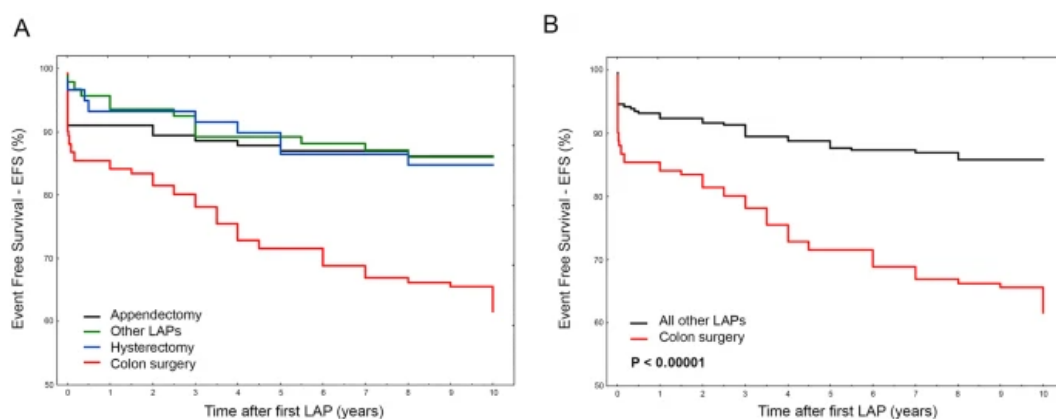
**Tabella 3:**

Type of LAP (n)	Whole group of LAPs (n = 426) [♀/♂, 235/191; 55.2% ♀]						All LAPs (no colon surgery) (n = 275) [♀/♂, 168/107; 61.1% ♀]			
	A (n = 212) n (%)	A vs B OR (CI; 95%)	P	A1 (n = 117) n (%)	A1 vs B1 OR <sup>1</sup> (CI; 95%)	P	A vs B OR (CI; 95%)	P	A1 vs B1 OR (CI; 95%)	P
<i>colon surgery (n = 151)</i> ♀, n = 67 ♂, n = 84	112 (74.2) 47 (70.1) 65 (77.3)	5.1 (3.24-7.8) 5.24 (2.82-9.72) 4.2 (2.22-7.95)	<b>0.0001</b> <b>0.0001</b> <b>0.0001</b>	69 (45.7) 28 (41.8) 41 (48.8)	4.41 (2.51-7.76) 5.33 (2.32-12.23) 3.44 (1.58-7.49)	<b>0.0001</b> <b>0.0001</b> <b>0.0001</b>	— — —	— — —	— — —	— — —
<i>appendectomy (n = 123)</i> ♀, n = 72 ♂, n = 51	43 (34.9) 22 (30.5) 21 (41.2)	0.43 (0.28-0.66) 0.49 (0.27-0.88) 0.36 (0.19-0.7)	<b>0.0001</b> <b>0.0150</b> <b>0.0022</b>	22 (17.9) 7 (9.7) 15 (23.4)	0.39 (0.22-0.72) 0.28 (0.11-0.73) 0.49 (0.21-1.10)	<b>0.0022</b> <b>0.0071</b> 0.08	0.9 (0.55-1.47) 0.97 (0.5-1.9) 0.75 (0.35-1.6)	n.s. n.s. n.s.	0.89 (0.44-1.8) 0.58 (0.2-1.68) 1.11 (0.40-3.06)	n.s. n.s. n.s.
<i>other surgery: splenectomy, cholecystectomy, (n = 93)</i> ♀, n = 37 ♂, n = 56	37 (39.8) 10 (27.0) 27 (48.2)	0.59 (0.37-0.95) 0.45 (0.21-0.98) 0.53 (0.28-0.99)	<b>0.029</b> <b>0.042</b> <b>0.047</b>	15 (16.1) 3 (8.1) 12 (21.4)	0.43 (0.22-0.86) 0.26 (0.07-0.97) 0.44 (0.19-1.05)	<b>0.0146</b> <b>0.0347</b> 0.0605	1.25 (0.74-2.10) 0.78 (0.35-1.77) 1.33 (0.62-2.86)	n.s. n.s. n.s.	0.89 (0.42-1.90) 0.5 (0.13-1.97) 0.9 (0.33-2.48)	n.s. n.s. n.s.
<i>Hysterectomy* (n = 59)</i>	20 (33.9)	0.63 (0.34-1.16)	n.s.	11 (18.6)	0.96 (0.4-2.34)	n.s.	1.23 (0.63-2.43)	n.s.	2.71 (0.96-7.72)	0.057

Esaminando i casi di occlusione intestinale suddivisi per diversi tipi di LAP (analisi della sopravvivenza complessiva), emerge una netta differenza nel tasso di sopravvivenza a 10 e 5 anni per la chirurgia del colon, rispetto ai restanti tipi di LAP che mostrano trend e frequenze simili (Grafico 1A). A causa di questa discrepanza, è stato condotto un confronto tra la chirurgia del colon e gli altri LAP combinati. Complessivamente, l'appendicectomia, la splenectomia, la colecistectomia e l'isterectomia hanno avuto un impatto minore sul Event Free Survival (EFS) rispetto alla chirurgia del colon (Grafico 1B), con un rischio di sviluppare un'occlusione intestinale dopo la chirurgia del colon, 3 volte superiore rispetto agli altri LAP (HR a 10 anni = 3,02, IC del 95%: 2,0-4,54; P < 0,00001 e HR a 5 anni = 2,48, IC del 95%: 1,58-3,9; P = 0,000075).



**Grafico 1:**



( A , B ) Sopravvivenza libera da eventi (EFS) a 10 anni per i diversi tipi di LAP originale. In ( A ) la presenza di ostruzione intestinale è stata analizzata in base ai diversi LAP nell'intera coorte di pazienti. La chirurgia del colon (linea rossa) differisce in termini di sopravvivenza rispetto ai restanti LAP che mostrano andamento e frequenza simili. In ( B ) l'occlusione intestinale dopo l'intervento chirurgico al colon è stata confrontata con quella ottenuta dai restanti LAP presi insieme (cioè appendicectomia, splenectomia, colecistectomia e isterectomia).

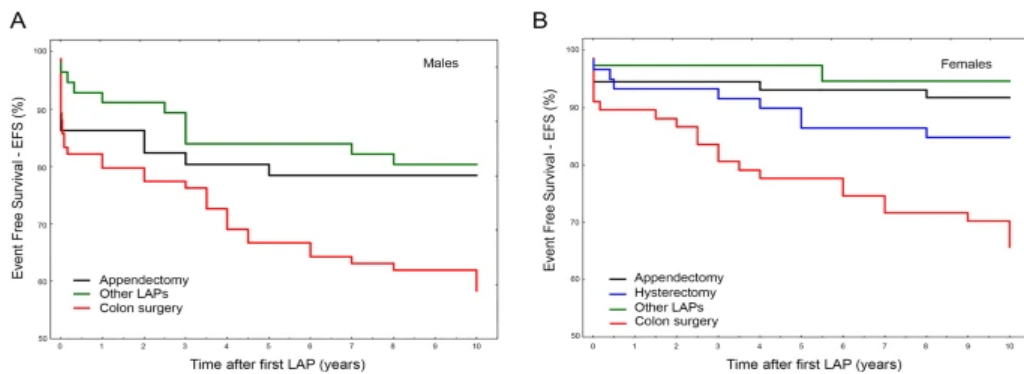
### **5.3 Correlazione tra LAP e occlusione intestinale (analisi di sopravvivenza correlata al genere)**

Globalmente, confrontando il tasso di insorgenza di aderenze addominali (AA) nell'intera coorte di casi, emerge una prevalenza maggiore nei maschi rispetto alle femmine (♂ 59,1% vs ♀ 42,1%; P = 0,006), così come nel tasso di insorgenza di occlusione intestinale (♂ 35,6% contro ♀ 20,8%; P = 0,001).

Questi dati non concordano con gli Odds Ratio (OR) più elevati osservati nelle donne, in particolare per la chirurgia del colon (vedi Tabella 3), contrastando a loro volta con le analisi di sopravvivenza senza eventi (EFS) stratificate per sesso, che attribuiscono ai maschi un rischio quasi doppio di occlusione intestinale rispetto alle femmine dopo qualsiasi LAP (♂ vs ♀: Hazard Ratio (HR) a 10 anni = 1,87, IC del 95%: 1,24–2,8; P = 0,0024 e HR a 5 anni = 2,03, IC del 95%: 1,34–3,38; P = 0,0013). Per questi motivi, abbiamo condotto una sottoanalisi separata specifica per sesso, stratificando gli eventi di occlusione intestinale in base a diversi tipi di LAP (Grafico 2A, B). Come previsto, la chirurgia del colon ha prodotto il tasso di sopravvivenza più basso, e questo era paragonabile in entrambi i sessi, sebbene i maschi soffrissero leggermente più delle

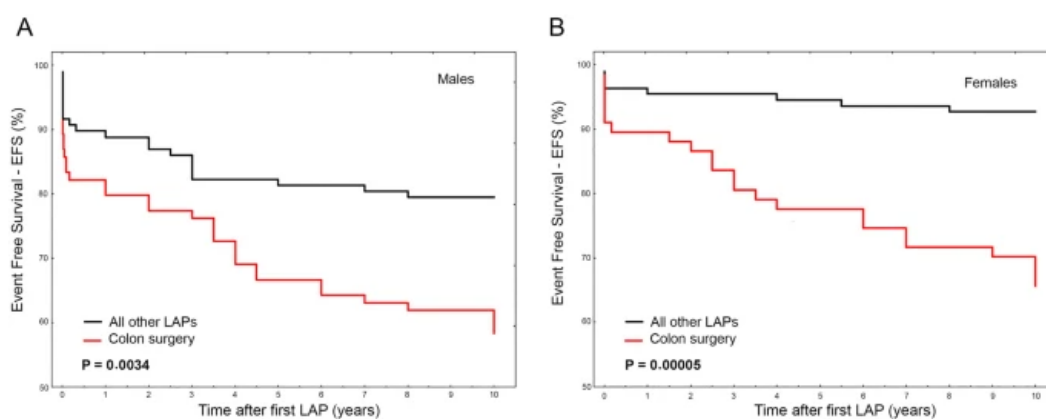
femmine. Di conseguenza, abbiamo unito appendicectomia, splenectomia e colecistectomia e le abbiamo confrontate con la chirurgia del colon in un'ulteriore sottoanalisi sessuale (Grafico 3A, B). Sebbene la chirurgia del colon abbia influenzato in modo simile femmine e maschi in termini di EFS (♀ vs ♂: P 10 anni = 0,317 e P 5 anni = 0,159), le altre procedure chirurgiche prese insieme hanno interessato più maschi che femmine (♀ vs ♂: P 10 anni = 0,013 e P 10 anni = 0,017). Pertanto, il rischio di occlusione intestinale dopo un intervento chirurgico al colon rispetto all'altro tipo di intervento chirurgico era quasi 2,5 volte maggiore nelle donne rispetto agli uomini (♀HR = 5,28, IC del 95%: 2,36–11,8; P = 0,00005 e ♂HR = 2,22, IC del 95%: 1,31–3,85; P = 0,0034). L'inclusione dell'isterectomia tra gli altri interventi chirurgici nel gruppo femminile ha leggermente ridotto il rischio complessivo (HR = 3,85, IC del 95%: 2,0–7,14; P = 0,000033).

**Grafico 2:**



( **A** , **B** ) Sottoanalisi di genere per la presenza di ostruzione intestinale in base a diversi LAP. In ( **A** ), indagine sulla sopravvivenza libera da eventi (EFS) a 10 anni per i diversi tipi di LAP originale nei maschi. In ( **B** ) indagine sulla sopravvivenza libera da eventi (EFS) a 10 anni per i diversi tipi di LAP originale nelle femmine.

### Grafico 3



( **A** , **B** ) Sottoanalisi di genere per la presenza di ostruzione intestinale in seguito a intervento chirurgico al colon *rispetto* agli altri LAP presi insieme. Sopravvivenza libera da eventi (EFS) all'indagine a 10 anni dopo intervento chirurgico al colon rispetto a quella dei rimanenti LAP presi insieme (ad esempio appendicectomia, splenectomia, colecistectomia) nei maschi ( **A** ) e nelle femmine ( **B** ).

#### 5.4 SNPs del fattore XIII nell'intera coorte di pazienti e nei sottogruppi: calcolo degli OR.

Le distribuzioni genotipiche e le frequenze alleliche per i geni F13A1 e F13B sono presentate nella Tabella 4, considerando l'intera coorte e i vari sottogruppi di pazienti. L'analisi del rischio attraverso i diversi modelli genetici nei gruppi e nei sottogruppi di pazienti è riportata nella Tabella 4. È importante notare che gli Odds Ratio (OR) più coerenti sono stati ottenuti confrontando il sottogruppo A1 vs B1, cioè pazienti con aderenze addominali (AA) complicata da occlusione intestinale rispetto a quelli senza AA verificata chirurgicamente. In modo simile, è degno di nota l'assenza di punteggi significativi confrontando il sottogruppo A2 vs B1, ovvero pazienti con AA asintomatica rispetto a quelli senza AA verificata chirurgicamente. Di conseguenza, la Tabella 5 riassume gli OR più rilevanti e affidabili ottenuti confrontando pazienti caratterizzati da diversi fenotipi clinici estremi.

Complessivamente, stratificando i pazienti-caso in base alla presenza/assenza di occlusione intestinale (cioè A1/A2) e i pazienti di controllo in base all'assenza di sviluppo o sintomi di AA (cioè B1/B2), si osserva un aumento delle frequenze degli alleli polimorfici del FXIII nei pazienti-caso e una diminuzione nei pazienti-controllo con effetti previsti sul calcolo del rischio (Tabella 5). Nel calcolo degli OR, ciò è particolarmente evidente quando si confrontano i fenotipi estremi dei casi rispetto ai

controlli (ad esempio A1 vs B1), soprattutto per Y204F e P564L (Tabella 5, pannello di destra).

È interessante notare che il confronto intragruppo dei pazienti con AA e occlusione intestinale (sottogruppo A1) con quelli con AA senza occlusione intestinale (sottogruppo A2) ha prodotto un rischio più elevato (ad esempio PP564 vs LL564; OR = 10,0; IC del 95%: 1,24–80,3; P = 0,010), sostenendo fortemente il ruolo degli SNP del FXIII nella predizione delle complicanze dell'AA, che meritano ulteriori analisi di sopravvivenza dedicate. Infine, pur riportando occasionalmente punteggi OR superiori a 20 volte nelle analisi (Tabelle 4 e 5) mediante l'uso di formule di approssimazione (vedi Metodi), è opportuno notare che tali valori sono stati inclusi solo per ipotizzare associazioni più forti, pur riconoscendo che l'assenza di genotipi specifici tra particolari sottogruppi potrebbe influenzare tali stime.

**Tabella 4:**

Groups	OR, 95% CI; P FXIII A V34L				OR, 95% CI; P FXIII A Y204F		OR, 95% CI; P FXIII A P564L				OR, 95% CI; P FXIII B H95R			
	VV vs LL	VV vs VL+LL	VV+VL vs LL	V vs L	YY vs YF	Y vs F	PP vs LL	PP vs PL+LL	PP+PL vs LL	P vs L	HH vs RR	HH vs HR+RR	HH+HR vs RR	H vs R
Group A vs Group B	1.32 (0.6–2.9) 0.474	0.96 (0.6–1.4) 0.905	1.37 (0.6–2.9) 0.420	1.03 (0.8–1.4) 0.812	5.25 (1.14–24.2) <b>0.033</b>	5.14 (1.12–23.6) <b>0.035</b>	2.43 (0.8–7.2) 0.107	1.30 (0.87–1.9) 0.196	2.29 (0.8–6.7) 0.131	1.33 (0.94–1.9) 0.103	0.15 (0.01–2.9) 0.220	1.36 (0.82–2.26) 0.20	0.14 (0.01–2.8) 0.197	1.20 (0.75–1.9) 0.445
Group A vs Group B1	3.22 (0.9–11.4) 0.067	1.40 (0.9–2.3) 0.151	3.02 (0.9–10.6) 0.084	1.50 (1.0–2.3) <b>0.05</b>	5.59 (0.7–44.3) 0.102	5.48 (0.7–43.1) 0.105	14.84 (0.86–255.1) 0.063	1.78 (1.07–2.9) <b>0.025</b>	13.07 (0.8–223.8) 0.076	1.87 (1.2–2.9) <b>0.006</b>	0.11 (0.01–2.3) 0.157	1.19 (0.66–2.2) 0.55	0.11 (0.01–2.2) 0.148	1.06 (0.61–1.8) 0.848
Group A1 vs Group B1	3.34 (0.9–12.8) 0.078	1.45 (0.8–2.5) 0.174	3.08 (0.8–11.7) 0.097	1.52 (0.97–2.4) 0.070	8.29 (1.02–67.4) <b>0.047</b>	8.04 (1.0–64.8) <b>0.05</b>	27.00 (1.55–469.1) <b>0.023</b>	2.26 (1.3–3.96) <b>0.004</b>	22.37 (1.3–386.4) <b>0.032</b>	2.42 (1.5–3.9) <b>0.0004</b>	0.21 (0.01–4.5) 0.320	1.57 (0.82–3.0) 0.172	0.19 (0.01–4.0) 0.287	1.34 (0.74–2.4) 0.337
Group A1 vs Group B	1.37 (0.5–3.4) 0.497	1.00 (0.6–1.6) 0.997	1.40 (0.6–3.4) 0.458	1.06 (0.7–1.5) 0.763	7.78 (1.62–37.3) <b>0.010</b>	7.54 (1.6–35.8) <b>0.011</b>	4.42 (1.45–13.4) <b>0.008</b>	1.66 (1.04–2.6) <b>0.032</b>	3.91 (1.3–11.7) <b>0.015</b>	1.71 (1.2–2.5) <b>0.006</b>	0.29 (0.01–5.0) 0.416	1.8 (1.01–3.15) <b>0.044</b>	0.26 (0.03–5.0) 0.370	1.53 (0.9–2.5) 0.114
Group A2 vs Group B1	3.08 (0.8–12.4) 0.108	1.32 (0.7–2.3) 0.266	2.44 (0.7–11.7) 0.125	1.41 (0.9–2.4) 0.123	2.43 (0.2–27.2) 0.471	2.41 (0.2–26.8) 0.473	3.86 (0.15–96.2) 0.410	1.29 (0.7–2.4) 0.413	3.63 (0.15–90.2) 0.431	1.29 (0.74–2.2) 0.370	0.23 (0.01–4.9) 0.347	0.8 (0.37–1.7) 0.551	0.24 (0.01–4.9) 0.352	0.72 (0.35–1.5) 0.370

Laddove gli zeri causano problemi con il calcolo dell'odds ratio o del suo errore standard, viene aggiunto 0,5 a tutte le celle. I valori P significativi sono mostrati in grassetto.

**Tabella 5:**

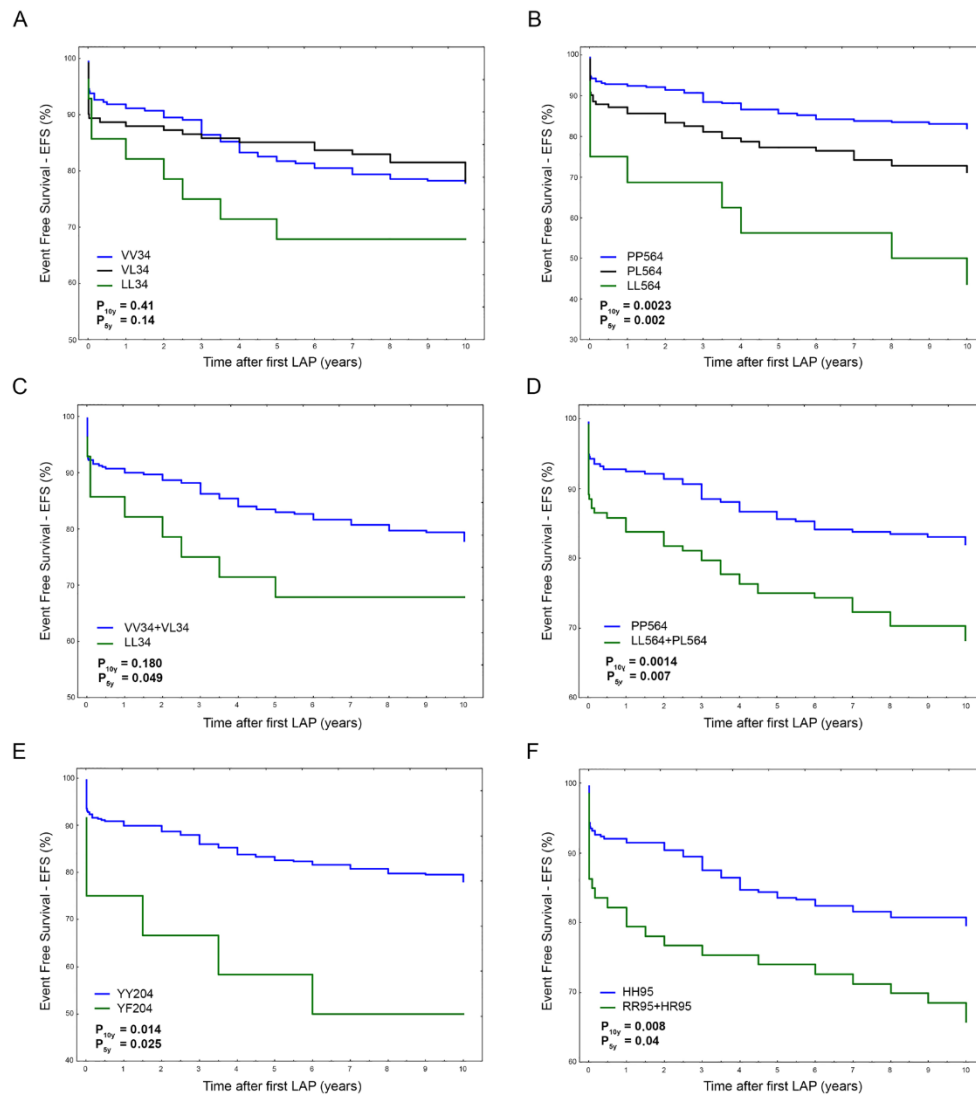
Clinical Phenotype (Group)	OR, 95% CI; P				Clinical Phenotype (Group)	OR, 95% CI; P				
	FXIII A V34L	FXIII A Y204F	FXIII A P564L	FXIII B H95R		FXIII A V34L	FXIII A Y204F	FXIII A P564L	FXIII B H95R	
Presence of AA (A; n = 212)	Absence of AA or symptoms (B; n = 214)	1.03 (0.8– 1.4) 0.812	5.14 (1.12– 23.6) <b>0.035</b>	2.43* (0.82– 7.2) 0.107	1.36 <sup>§</sup> (0.82– 2.26) 0.20	Absence of AA or symptoms (B; n = 214)	1.06 (0.7– 1.5) 0.763	7.54 (1.6– 35.8) <b>0.011</b>	4.42* (1.45– 13.4) <b>0.008</b>	1.8 <sup>§</sup> (1.01– 3.15) <b>0.044</b>
	Absence of AA at LAP (B1; n = 114)	1.50 (1.0– 2.3) <b>0.05</b>	5.48 (0.7– 43.1) 0.105	14.84* (0.86– 255.1) 0.063	1.19 <sup>§</sup> (0.66–2.2) 0.55	Presence of AA and bowel obstruction (A1; n = 117)	Absence of AA at LAP (B1; n = 114)	1.52 (0.97– 2.4) 0.070	8.04 (1.0– 64.8) <b>0.05</b>	27.00* (1.55– 469.1) <b>0.023</b>

### ***5.5 Analisi di sopravvivenza FXIII SNPs nell'intera coorte e nei sottogruppi: analisi singole.***

Dato che l'occlusione intestinale causata da aderenze addominali (AA) può manifestarsi anche molti anni dopo la lesione tissutale iniziale, abbiamo cercato di individuare possibili associazioni dipendenti dal tempo dei geni FXIII con l'occlusione intestinale. Abbiamo quindi stratificato i pazienti in base ai diversi SNP del fattore XIII e, come prima, abbiamo condotto analisi di sopravvivenza a breve e lungo termine dal primo intervento chirurgico originale (rispettivamente a 5 e 10 anni).

È interessante notare che la variante genica V34L seguiva un modello genetico recessivo, a differenza di P564L che mostrava un effetto di dosaggio del gene in linea con un modello genetico dominante (Grafico 4A, B). Pertanto, abbiamo calcolato VV34 + VL34 vs LL34 e PP564 vs PL564 + LL564 nell'analisi di sopravvivenza e nei calcoli del rischio di pericolo (Grafico 4C, D). Gli altri due SNPs (Y204F e H95R) non presentavano (abbastanza) casi omozigoti per l'allele raro polimorfico (rispettivamente FF204 e RR95), pertanto abbiamo eseguito un classico confronto tra due gruppi portatori vs non portatori (Grafico 4E, F).

## Grafico 4:



(A–F) Sopravvivenza libera da eventi complessiva (EFS) per l'occorrenza di ostruzione intestinale a 10 anni in base ai diversi SNP del fattore XIII considerati. F13A1 V34L (VV contro VL contro LL) (A); F13A1 P564L (PP contro PL contro LL) (B); F13A1 V34L (VV + VL contro LL) (C); F13A1 P564L (PP contro PL + LL) (D); F13A1 Y204F (AA vs YF) (E); F13B H95R (HH vs HR + RR) (F).

### 5.6 Analisi di sopravvivenza FXIII SNPs nell'intera coorte e nei sottogruppi: analisi combinate.

Nonostante le variazioni in misura, la presenza di qualsiasi allele polimorfico nel gene FXIII era associata a un aumento del rischio di sviluppare un'ostruzione intestinale sia nel follow-up più lungo che in quello più breve (Tabella 6). Pertanto, abbiamo

confrontato i pazienti wild-type per ciascun SNP considerato (alleli comuni) con quelli portatori di almeno un allele polimorfico (alleli rari) in qualsiasi gene FXIII. Come evidenziato nella Tabella 6, non sono emerse variazioni significative nei punteggi di rischio unendo insieme tutti i portatori (qualsiasi SNP), e i rischi di pericolo risultanti rientravano nell'intervallo di quelli ottenuti dalle singole analisi SNP.

Di conseguenza, i punteggi per il confronto degli interi gruppi (A vs B) erano HR a 10 anni = 2,49, IC del 95%: 1,61–3,84 (P = 0,00004) e HR a 5 anni = 2,16, IC del 95%: 1,34–3,50 (P = 0,0015), rispettivamente per la sopravvivenza estesa e breve. Il confronto dei sottogruppi (A1 vs B1) non ha modificato sostanzialmente il calcolo del rischio.

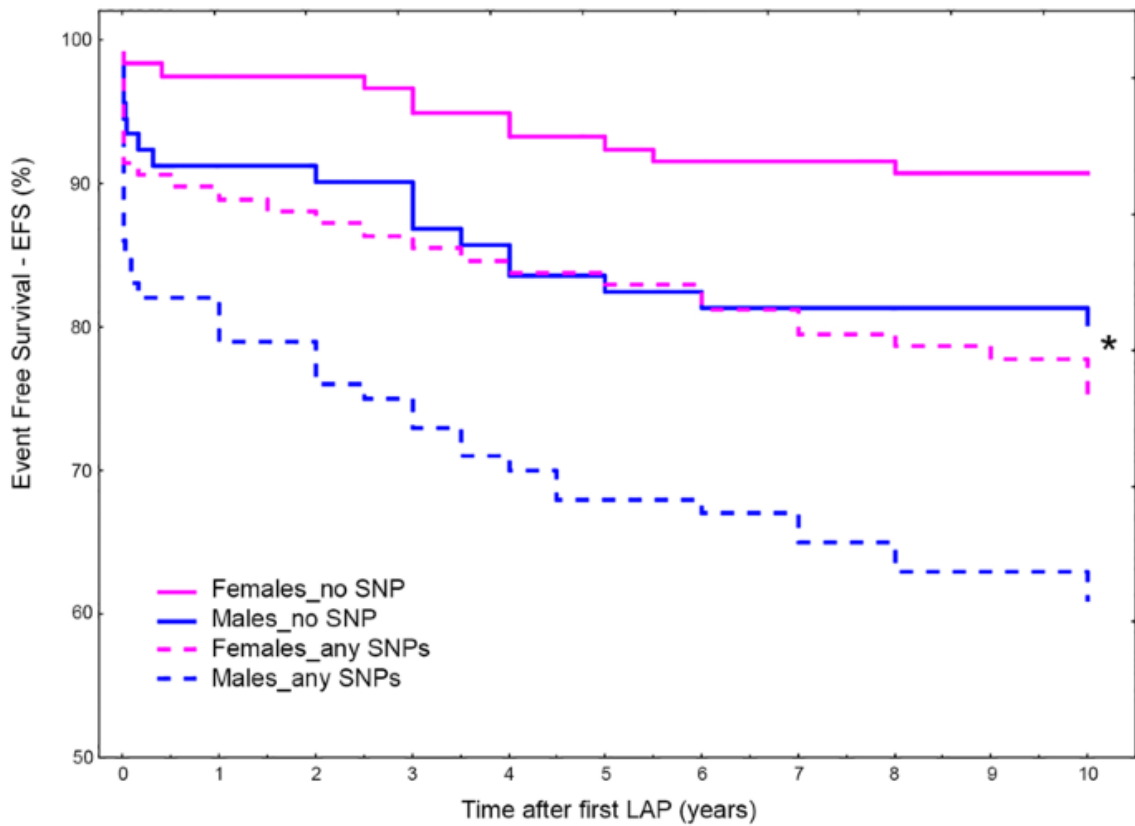
**Tabella 6:**

FXIII genotypes	A1 vs B1		A vs B	
	10 years survival HR, 95% CI; P	5 years survival HR, 95% CI; P	10 years survival HR, 95% CI; P	5 years survival HR, 95% CI; P
FXIII A V34L	2.69 (1.35–5.36) <b>0.005</b>	3.1 (1.54–6.23) <b>0.0015</b>	1.6 (0.8–3.15) 0.180	2.00 (1.00–4.02) <b>0.049</b>
FXIII A P564L	2.12 (1.43–3.17) <b>0.0002</b>	1.99 (1.28–3.13) <b>0.0025</b>	1.91 (1.28–2.85) <b>0.0014</b>	1.85 (1.18–2.89) <b>0.007</b>
FXIII A Y204F	2.11 (0.92–4.83) 0.076	2.07 (0.34–5.14) 0.11	2.81 (1.23–6.4) <b>0.014</b>	2.81 (1.13–6.95) <b>0.025</b>
FXIII B H95R	1.53 (0.97–2.42) 0.065	1.43 (0.85–2.4) 0.176	1.84 (1.17–2.9) <b>0.008</b>	1.71 (1.02–2.88) <b>0.04</b>
Any SNP	2.49 (1.60–3.85) <b>0.00004</b>	2.11 (1.31–3.41) <b>0.002</b>	2.49 (1.61–3.84) <b>0.00004</b>	2.16 (1.34–3.50) <b>0.0015</b>

*I valori P significativi sono mostrati in grassetto.*

Infine, l'analisi specifica per genere ha ulteriormente confermato il ruolo di fattore di rischio genetico nella presenza di qualsiasi SNP del fattore XIII nel genotipo dei pazienti, attribuendo ai geni del fattore XIII A e B la funzione di predisposizione ereditaria alla formazione di aderenze addominali (AA) o all'occlusione intestinale dopo l'intervento chirurgico. In particolare, sebbene maschi e femmine avessero Hazard Ratio (HR) simili (♀HR = 2,88, IC del 95%: 1,44–5,76; P = 0,0028 e ♂HR = 2,21, IC del 95%: 1,26–3,87; P = 0,0054), si sono manifestate evidenti differenze nei loro andamenti (Figura 7). In un confronto reciproco, la presenza di qualsiasi SNP del FXIII attribuito ai maschi ha mostrato un rischio 1,5 volte maggiore rispetto alle femmine (HR = 1,51; IC del 95%: 1,04–2,19; P = 0,032). È interessante notare che i maschi wild type per gli SNP studiati hanno presentato un Event Free Survival (EFS) sovrapposto a quello delle femmine portatrici (Grafico 5).

**Grafico 5:**



*Sopravvivenza libera da eventi complessiva (EFS) per la presenza di ostruzione intestinale in un sondaggio a 10 anni per SNP del fattore XIII (qualsiasi) in maschi e femmine. EFS in pazienti portatori di uno qualsiasi degli SNP considerati rispetto a pazienti portatori di nessun SNP (cioè wild type per tutti gli SNP considerati). (\*) È interessante notare che le femmine portatrici di qualsiasi SNP (linea rosa tratteggiata) e i maschi wild type per tutti gli SNP considerati (linea blu continua) mostrano curve di sopravvivenza completamente sovrapposte.*



## 6 DISCUSSIONE

Nonostante le evidenze robuste che le aderenze addominali siano la complicanza più comune nella chirurgia addominale, si è compiuto poco progresso nel riconoscimento di marcatori molecolari per prevenire l'insorgenza di occlusione intestinale. A differenza di altri tipi di complicanze postoperatorie, le AA rendono i pazienti a rischio per tutta la vita di varie condizioni patologiche. Ciò comporta costi elevati in entrambi i sessi, sebbene si debba tenere presente che le spese riguardanti le donne in età fertile sono più del doppio, considerando l'alta incidenza di infertilità tubarica dovuta alle AA che richiedono costose procedure di fecondazione in vitro (IVF) [59,60]. I pazienti con AA e dolore addominale cronico sono stati affrontati con adesiolisi laparoscopica, ma la procedura è ancora controversa, causando spesso altre AA in un circolo vizioso, e non è chiaro se l'adesiolisi porti ad un sollievo sostanziale dal dolore, alla preservazione della fertilità femminile o al miglioramento della qualità della vita [61-62].

Per contrastare la formazione di AA e il conseguente onere economico per i sistemi sanitari nazionali, sono stati condotti studi di costo-beneficio di prove di barriere anti-AA. Questi hanno fornito risultati incoraggianti, in particolare per la riduzione delle complicanze legate all'occlusione intestinale, invece i dati sulla preservazione della fertilità femminile non sono definitivi [7,63]. L'applicazione di barriere anti-AA è costosa e richiede tempo operativo supplementare, pertanto il posizionamento delle barriere dovrebbe essere preferenzialmente mirato a casi selezionati ad alto rischio. Per questo motivo, il riconoscimento delle predisposizioni ereditarie predittive e/o dei biomarcatori utili per identificare in anticipo i pazienti a rischio potrebbe aiutare i clinici nell'istituire programmi mirati di prevenzione.

Tra gli interventi di chirurgia al colon, almeno il 75% dei pazienti ha sviluppato AA e, tra questi, più del 60% ha sperimentato un'occlusione intestinale. Al contrario, gli altri tipi di LAP hanno prodotto un tasso complessivo inferiore al 20%. Da una prospettiva di genere, nonostante la prova che i maschi sviluppino più frequentemente AA o occlusione intestinale rispetto alle femmine, queste ultime sembravano avere punteggi di rischio più elevati dopo la chirurgia al colon. Il risultato apparentemente in contrasto può essere spiegato dalla sotto-analisi specifica per genere che ha attribuito alla chirurgia al colon il principale fattore scatenante di AA e occlusione intestinale in entrambi i sessi, ma le femmine hanno subito più frequentemente la chirurgia al colon

rispetto agli altri LAP, il che ha loro attribuito un rischio più elevato ( $\text{♀HR} = 5,28, 2,36-11,8; P = 0,00005$  e  $\text{♂HR} = 2,22, 1,31-3,85; P = 0,0034$ ).

Insieme al diverso grado atteso nel punteggio di rischio attribuibile ai diversi tipi di LAP, il risultato principale del presente studio è che i principali polimorfismi di singolo nucleotide (SNP) all'interno dei geni F13A1 o F13B svolgono il ruolo di marcatori molecolari ereditari nella predizione di AA e/o occlusione intestinale, con interessanti distinzioni di genere.

In dettaglio, FXIII A P564L e FXIII A Y204F hanno mostrato i punteggi più elevati, con OR grezzi che vanno da 4,42 (PP vs LL) fino a 8,29 volte (YY vs YF) in gruppo A1 vs gruppo B e gruppo A1 vs gruppo B1 rispettivamente. Considerando che il gruppo A1 includeva i fenotipi clinici estremi peggiori, tale associazione potrebbe attribuire agli SNP un ruolo potenziale come marcatori prognostici per l'ostruzione intestinale dopo l'intervento chirurgico.

Inoltre, il confronto tra pazienti con AA in assenza di occlusione intestinale e pazienti che non hanno sviluppato AA (gruppo A2 vs B1) non ha fornito alcuna associazione significativa, suggerendo che gli SNPs del FXIII potrebbero effettivamente predire la progressione da AA asintomatico al fenotipo clinico più grave. Di conseguenza, è stata eseguita un'ulteriore analisi intra-gruppo tra tutti i pazienti che hanno sviluppato AA, ovvero quelli con occlusione intestinale vs quelli senza occlusione intestinale (gruppi A1 vs A2). Questa analisi ha confermato definitivamente la nostra ipotesi, producendo un significativo aumento di dieci volte del rischio di occlusione intestinale quando venivano confrontati gli omozigoti opposti (PP vs LL).

Anche il confronto tra l'intero gruppo (A vs B) ha fornito risultati significativi con un aumento del rischio di più di cinque volte nei pazienti portatori della variante Y204F, anche se va considerato che questi due gruppi includono anche casi con AA in assenza di occlusione intestinale nel corso di un periodo di quasi dieci anni (sottogruppo-A2) e casi che semplicemente non hanno riportato sintomi correlati all'AA dopo il primo LAP (sottogruppo B2). Questa osservazione contrasta in parte con la nostra precedente speculazione sul potenziale ruolo dei geni del FXIII come indicatori prognostici di occlusione intestinale. In realtà, è impossibile prevedere "se" e "quando" si sviluppa un'occlusione intestinale in un paziente con AA, a causa della natura multifattoriale di questa grave complicanza. Pertanto, potremmo solo ipotizzare di considerare i geni del

FXIII come predittori sia dell'AA che delle loro complicanze nei pazienti sottoposti a intervento chirurgico.

In sintesi, dato che tutti i casi arruolati nel nostro studio sono stati sottoposti a precedenti interventi LAP e:

- alcuni di essi hanno sviluppato occlusione intestinale entro 10 anni dal primo LAP (A1);
- altri non hanno sviluppato occlusione intestinale nel periodo medio di circa 10 anni nonostante la presenza di AA (A2);
- altri ancora non hanno sviluppato né occlusione intestinale né AA in un periodo di almeno 10 anni (B1);
- altri ancora non hanno avuto sintomi correlati alla presenza di AA per almeno 10 anni (B2);

si è ritenuto estremamente interessante indagare se quegli SNPs del FXIII associati ad AA o occlusione intestinale avessero anche effetti sulla sopravvivenza senza eventi (EFS) mediante analisi dedicate di Kaplan-Meier.

La presenza di qualsiasi SNPs nei geni del FXIII ha influenzato significativamente l'EFS, producendo HR di circa 2,5 volte a 10 anni di follow-up ( $P = 0,00004$ ). In dettaglio, FXIII A V34L ha raggiunto l'HR più alto fino a 3,1 volte a 5 anni di follow-up e in generale il confronto tra fenotipi estremi (cioè A1 vs B1) ha fornito punteggi di rischio più elevati. Questo è stato particolarmente evidente per le varianti più comuni V34L e P564L rispetto ai polimorfismi meno frequenti (cioè Y204F e H95R), nei quali la suddivisione dei gruppi ha influenzato in misura maggiore la potenza statistica.

Inoltre, mediante analisi di genere, abbiamo valutato se i geni FXIII avessero una diversa capacità nel prevedere l'occlusione intestinale. Anche se le analisi intragrupo hanno fornito rischi simili per maschi e femmine, le analisi intergruppo hanno assegnato alla presenza di qualsiasi SNP uno score di rischio sommato come segue:  $\text{any-SNP}_{\text{♂}} > \text{any-SNP}_{\text{♀}} \cong \text{no-SNP}_{\text{♂}} > \text{no-SNP}_{\text{♀}}$ . Ciò ha portato al paradosso che le femmine portatrici di any-SNP mostravano un rischio basso quanto i maschi portatori di no-SNPs.

Questi dati suggeriscono che maschi e femmine hanno sperimentato il rischio di complicazioni addominali post-chirurgiche in modo completamente diverso, sia

considerando il rischio primario legato all'intervento chirurgico sia la predisposizione genetica ereditaria al rischio.

La formazione di un'aderenza addominale post-chirurgica inizia con lesioni alle superfici mesoteliali, portando all'esposizione della membrana basale e all'attivazione di diversi processi molecolari finalizzati a riparare il danno. Tra i composti efficaci nella prevenzione delle AA, alcuni farmaci appartengono all'area degli anticoagulanti/fibrinolitici, presumibilmente inibendo piastrine e deposito eccessivo di fibrina, mentre altri appartenenti all'area anti-infiammatoria modulano la risposta dei neutrofili/macrofagi, la cascata citochinica e la permeabilità vascolare [9].

Il FXIII ha un ruolo nella coagulazione, fibrinolisi, infiammazione e controllo delle infezioni, tutti passaggi chiave che, quando sono sbilanciati, sono responsabili della guarigione anomala delle ferite, fondamentale per la formazione di aderenze [40,45]. Dopo una lesione, il FXIII regola finemente la maglia di fibrina durante la coagulazione del sangue, formando il miglior substrato e ambiente, fornendo uno scheletro provvisorio in 3D per la crescita cellulare successiva e la deposizione di proteine della matrice extracellulare (ECM). Un fallimento del sistema fibrinolitico o una lenta degradazione della maglia di fibrina potrebbero portare alla perpetuazione non necessaria dello scheletro in cui fibroblasti e altre cellule riparatrici possono migrare e proliferare con una deposizione eccessiva di collagene e altre proteine della matrice extracellulare, supportando la formazione di un tessuto connettivo fibroso permanente.

Il principale SNP V34L investigato, contribuisce a un rilascio precoce del peptide di attivazione del FXIIIA, essendo molto vicino al sito di attivazione della trombina (R37-G38), mentre l'H95R supporta la dissociazione del tetramero FXIIIA<sub>2</sub>B<sub>2</sub> essenziale per l'attivazione completa del FXIII. L'SNP V34L è considerato il principale locus funzionale tra gli SNP del FXIII, mentre gli altri SNP sono stati meno studiati, anche se hanno attirato ampia attenzione nel campo della trombosi e della guarigione delle ferite a causa degli effetti sia sul livello che sull'attività del FXIII [38,42-45]. Di conseguenza, una variante genetica potrebbe agire come predisposizione ereditaria protettiva quando contrasta una guarigione ritardata o inefficace, come nel caso di lesioni cutanee croniche. Al contrario, la stessa variante genetica, quando inserita in un processo incontrollato o disregolato, potrebbe portare a una riparazione eccessiva con conseguenze negative e complicazioni come fibrosi e formazione di aderenze, come

precedentemente descritto in contesti diversi di altre malattie complesse e multifattoriali.

Dopo una lesione tissutale, iniziano meccanismi riparativi multifattoriali e complessi in cui diversi geni giocano un ruolo fondamentale. Sebbene infiammazione, angiogenesi e immunità siano fattori chiave, i processi riparativi coinvolgono principalmente coagulazione e fibrinolisi. Di conseguenza, l'organizzazione adeguata di uno scheletro tridimensionale di fibrina potrebbe essere responsabile di una guarigione ottimale (senza aderenze), mentre una guarigione squilibrata o eccessiva potrebbe favorire le aderenze. Per questi motivi, abbiamo esaminato il gene della coagulazione FXIII, coinvolto necessariamente in ogni processo di guarigione. Inoltre, ulteriori geni candidati, tra cui IL-1RN, PAI-1, FGB, TAFI e HLA, sono stati considerati come fattori emergenti nella patogenesi delle aderenze post-operatorie [63-67].

Attualmente, l'uso di marcatori molecolari che predicono il rischio e la progressione di una malattia è uno strumento pratico e maneggevole, tradotto con successo nella pratica clinica a un costo accessibile e con un vantaggioso rapporto costo/beneficio. Il riconoscimento di predisposizioni ereditarie predittive o biomarcatori utili per valutare in anticipo i pazienti a rischio che potrebbero beneficiare del posizionamento di barriere anti-AA in pazienti selezionati ad alto rischio. Per ottimizzare lo sfruttamento clinico di questo approccio, lo sviluppo di microarray di SNP dedicati e personalizzati potrebbe ridurre ulteriormente i costi e aprire la strada a procedure di medicina di precisione fattibili ed economicamente convenienti.

I nostri risultati mostrano che le predisposizioni genetiche ereditarie favoriscono lo sviluppo di complicazioni addominali post-chirurgiche in modo specifico al genere. Studi di conferma su coorti più ampie e studi multicentrici convalideranno il loro forte ruolo farmacogenetico in una prospettiva di medicina tradizionale e di precisione.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- 1.K. Okabayashi, H. Ashrafian, E. Zacharakis, H. Hasegawa, Y. Kitagawa, T. Athanasiou, A. Darzi, Adhesions after abdominal surgery: a systematic review of the incidence, distribution and severity, *Surg. Today* 44 (3) (2014) 405–420]
2. R.M.F.M. Leclercq, K.W.Y. Van Barneveld, M.H.F. Schreinemacher, R. Assies, M. Twellaar, N.D. Bouvy, J.W.M. Muris, Postoperative abdominal adhesions and bowel obstruction. A survey among Dutch general practitioners, *Eur. J. Gen. Pract.* 21 (3) (2015) 176–182.
- 3.A. Rocca, G. Aprea, G. Surfaro, M. Amato, A. Giuliani, M. Paccone, A. Salzano, A. Russo, D. Tafuri, B. Amato, Prevention and treatment of peritoneal adhesions in patients affected by vascular diseases following surgery: a review of the literature, *Open Med.* 11 (1) (2016) 106–114
4. Y. Pilpel, G. Pines, A. Birkenfeld, S.R. Bornstein, R. Miller, Metabolic syndrome is a risk factor for post-operative adhesions: need for novel treatment strategies, *Horm. Metab. Res.* 51 (1) (2019) 35–41.
- 5.W.W. Vrijland, J. Jeekel, H.J. van Geldorp, D.J. Swank, H.J. Bonjer, Abdominal adhesions - intestinal obstruction, pain, and infertility, *Surg. Endosc. Intervent. Tech.* 17 (7) (2003) 1017–1022
- 6.Bruggmann, D. et al. Intra-abdominal adhesions: definition, origin, significance in surgical practice, and treatment options. *Deutsches Arzteblatt International* 107, 769–775, <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0769> (2010).
- 7.Tang J, Xiang Z, Bernards MT, Chen S. Peritoneal adhesions: Occurrence, prevention and experimental models. *Acta Biomater.* 2020 Oct 15;116:84-104. doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.036. Epub 2020 Aug 29. PMID: 32871282.
- 8.Dijkstra F.R., Nieuwenhuijzen M., Reijnen M.M., van Gor H.. Recent clinical developments in pathophysiology, epidemiology, diagnosis and treatment of intra-abdominal adhesions. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 2000; 232: 52-59.

9. Fortin, C. N., Saed, G. M. & Diamond, M. P. Predisposing factors to post-operative adhesion development. *Human Reproduction Update* 21, 536–551, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv021> (2015).
10. Ivarsson M.L., Holmdahl L., Franzen G., Risberg B., Cost of bowel obstruction resulting from adhesions. *Eur J Surg.* 1997; 163 (9): 679-684
11. Ellis H., The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction. *Eur J Surg Suppl* 1997; 577: 5-9
12. The American Fertility Society classifications of adnexal adhesions, distal tubal occlusion, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancies, müllerian anomalies and intrauterine adhesions. *Fertil Steril.* 1988 Jun;49(6):944-55.
13. Zühlke HV, Lorenz EM, Straub EM, Savvas V: Pathophysiology and classification of adhesions. *Langenbecks Arch Chir Verh Dtsch Ges Chir* 1990, Suppl 2:1009–1016.
14. Coccolini F, Ansaloni L, Manfredi R, Campanati L, Poiasina E, Bertoli P, Capponi MG, Sartelli M, Di Saverio S, Cucchi M, Lazzareschi D, Pisano M, Catena F. Peritoneal adhesion index (PAI): proposal of a score for the "ignored iceberg" of medicine and surgery. *World J Emerg Surg.* 2013 Jan 31;8(1):6. doi: 10.1186/1749-7922-8-6. PMID: 23369320; PMCID: PMC3573980.
15. Mueller MD, Tschudi J, Herrmann U, Klaiber C. An evaluation of laparoscopic adhesiolysis in patients with chronic abdominal pain. *Surg Endosc.* 1995 Jul;9(7):802-4.
16. Ten Broek RP, Issa Y, van Santbrink EJ, et al. Burden of adhesions in abdominal and pelvic surgery: systematic review and met-analysis. *BMJ.* 2013;347:f5588.
17. Ten Broek RPG, Krielen P, Di Saverio S, et al. Bologna guidelines for diagnosis and management of adhesive small bowel obstruction (ASBO): 2017 update of the evidence-based guidelines from the world society of emergency surgery ASBO working group. *World J Emerg Surg.* 2018;19(13):24.
- 18 Cheong Y, Saran M, Hounslow JW, Reading IC. Are pelvic adhesions associated with pain, physical, emotional and functional characteristics of women presenting with chronic pelvic pain? A cluster analysis. *BMC Womens Health.* 2018 Jan 8;18(1):11. doi: 10.1186/s12905-017-0509-5. PMID: 29310639; PMCID: PMC5759355.

19. Di Saverio S, Catena F, Ansaloni L, Gavioli M, Valentino M, Pinna AD. Watersoluble contrast medium (gastrografin) value in adhesive small intestine obstruction (ASIO): a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *World J Surg.* 2008;32(10):2293–304.
20. Awonuga AO, Fletcher NM, Saed GM, Diamond MP. Postoperative adhesion development following cesarean and open intra-abdominal gynecological operations: a review. *Reprod Sci.* 2011 Dec;18(12):1166-85.
21. Goldberg JM, Falcone T, Diamond MP. Current controversies in tubal disease, endometriosis, and pelvic adhesion. *Fertil Steril.* 2019 Sep;112(3):417-425. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.06.021. PMID: 31446901.
22. Canis M, Botchorishvili R, Bourdel N, Gremeau AS, Curinier S, Rabischong B. Pelvic adhesions and fertility: Where are we in 2018? *J Visc Surg.* 2018 Jun;155 Suppl 1:S11-S15. doi: 10.1016/j.jviscsurg.2018.02.004. Epub 2018 May 18. PMID: 29784584.
23. Sulaiman H, Gabella G, Davis MSc C, Mutsaers SE, Boulos P, Laurent GJ, Herrick SE. Presence and distribution of sensory nerve fibers in human peritoneal adhesions. *Ann Surg* 2001; 234: 256-261
24. van Goor H. Consequences and complications of peritoneal adhesions. *Colorectal Dis.* 2007 Oct;9 Suppl 2:25-34.
25. Van Der Krabben AA, Dijkstra FR, Nieuwenhuijzen M, Reijnen MM, Schaapveld M, Van Goor H. Morbidity and mortality of inadvertent enterotomy during adhesiotomy. *Br J Surg.* 2000 Apr;87(4):467-71.
26. Tang CL, Seow-Choen F, Fook-Chong S, Eu KW. Bioresorbable adhesion barrier facilitates early closure of the defunctioning ileostomy after rectal excision: a prospective, randomized trial. *Dis Colon Rectum.* 2003 Sep;46(9):1200-7.
27. Arung W, Meurisse M, Detry O. Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. *World J Gastroenterol.* 2011 Nov 7;17(41):4545
28. Chegini, N. Peritoneal molecular environment, adhesion formation and clinical implication. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 7, e91–115 (2002).
29. Sammour, T., Kahokehr, A., Soop, M. & Hill, A. G. Peritoneal damage: the inflammatory response and clinical implications of the neuro-immuno-humoral axis. *World journal of surgery* 34, 704–720, <https://doi.org/10.1007/s00268-009-0382-y> (2010).



30. van der Wal, J. B. & Jeekel, J. Biology of the peritoneum in normal homeostasis and after surgical trauma. *Colorectal disease: the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 9(Suppl 2), 9–13, <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2007.01345.x> (2007).
31. Blasi, F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 15, 105–111, <https://doi.org/10.1002/bies.950150206> (1993).
32. Holmdahl L. The plasmin system, a marker of the propensity to develop adhesions. In: DiZerega GS, editor. *Peritoneal surgery*. New York: Springer-Verlag, 2000: 117-131
- 33 H. Capella-Monsonís, S. Kearns, J. Kelly, D.I. Zeugolis, Battling adhesions: from understanding to prevention, *BMC Biomed. Eng.* 1 (2019) 5.
- 34 K. Torres, L. Pietrzyk, Z. Plewa, K. Zaluska-Patel, M. Majewski, E. Radzikowska, A. Torres, TGF-beta and inflammatory blood markers in prediction of intraperitoneal adhesions, *Adv. Med. Sci.* 63 (2) (2018) 220–223
35. Rout UK, Diamond MP. Role of plasminogen activators during healing after uterine serosal lesioning in the rat. *Fertil Steril* 2003; 79: 138-145
36. Atta HM. Prevention of peritoneal adhesions: a promising role for gene therapy. *World J Gastroenterol.* 2011 Dec 14;17(46):5049-58.
- 37 . Ariëns RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood.* 2002 Aug 1;100
38. Gemmati, D. et al. Coagulation Factor XIIIa (F13A1): Novel Perspectives in Treatment and Pharmacogenetics. *Current Pharmaceutical Design* 22, 1449–1459 (2016).
39. Hoppe, B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Trombosis and haemostasis* 112, 649–658, <https://doi.org/10.1160/TH14-01-0085> (2014).
40. Ichinose, A. Factor XIII is a key molecule at the intersection of coagulation and fibrinolysis as well as inflammation and infection control. *International Journal of Hematology* 95, 362–370, <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1064-3> (2012).
41. Inbal, A. & Dardik, R. Role of coagulation factor XIII (FXIII) in angiogenesis and tissue repair. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 35, 162–165, <https://doi.org/10.1159/000093562> (2006).

42. Zamboni P, De Mattei M, Ongaro A, Fogato L, Carandina S, De Palma M, Tognazzo S, Scapoli GL, Serino ML, Caruso A, Liboni A, Gemmati D.: Factor XIII contrasts the effects of metalloproteinases in human dermal fibroblast cultured cells. *Vasc Endovascular Surg.* 2004 Sep-Oct;38(5):431-8.
43. Trumbo TA, Maurer MC. Examining thrombin hydrolysis of the factor XIII activation peptide segment leads to a proposal for explaining the cardioprotective effects observed with the factor XIIIIV34L mutation. *J Biol Chem.* 2000;275:20627-20631.
44. Komanasin N, Catto AJ, Futers TS, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Ariëns RA. A novel polymorphism in the factor XIII B-subunit (His95Arg): relationship to subunit dissociation and venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005 Nov;3(11):2487-96.
45. Gemmati D, Federici F, Campo G, Tognazzo S, Serino ML, De Mattei M, Valgimigli M, Malagutti P, Guardigli G, Ferraresi P, Bernardi F, Ferrari R, Scapoli GL, Catozzi L. Factor XIII A-V34L and factor XIII B-H95R gene variants: effects on survival in myocardial infarction patients. *Mol Med.* 2007 Jan-Feb;13(1-2):112-20.
46. Gemmati D, Tognazzo S, Catozzi L, Federici F, De Palma M, Giancesini S, Scapoli GL, De Mattei M, Liboni A, Zamboni P. Influence of gene polymorphisms in ulcer healing process after superficial venous surgery. *J Vasc Surg.* 2006 Sep;44(3):554-62.
47. Gemmati D, Federici F, Catozzi L, Giancesini S, Tacconi G, Scapoli GL, Zamboni P DNA-array of gene variants in venous leg ulcers: detection of prognostic indicators. *J Vasc Surg.* 2009 Dec;50(6):1444-51.
48. Gemmati D, Serino ML, Ongaro A, Tognazzo S, Moratelli S, Resca R, Moretti M, Scapoli GL. A common mutation in the gene for coagulation factor XIII-A (VAL34Leu): a risk factor for primary intracerebral hemorrhage is protective against atherothrombotic diseases. *Am J Hematol.* 2001 Jul;67(3):183-8.
49. Sugitani K, Ogai K, Hitomi K, Nakamura-Yonehara K, Shintani T, Noda M, Koriyama Y, Tanii H, Matsukawa T, Kato S. A distinct effect of transient and sustained upregulation of cellular factor XIII in the goldfish retina and optic nerve on optic nerve regeneration. *Neurochem Int.* 2012 Aug;61(3):423-32
50. Parmeggiani F, Costagliola C, Incorvaia C, Gemmati D, D'Angelo S,

- Tognazzo S, Scapoli GL, Sebastiani A. Prevalence of factor XIII Val34Leu polymorphism in patients affected by spontaneous subconjunctival hemorrhage. *Am J Ophthalmol*. 2004 Sep;138(3):481-4.
51. Parmeggiani F, Costagliola C, Incorvaia C, Sebastiani A, Gemmati D. Pharmacogenetic aspects in therapeutic management of subfoveal choroidal neovascularisation: role of factor XIII-A 185 T-allele. *Curr Drug Targets*. 2011 Feb;12(2):138-48.
52. Adhesion Scoring Group. Improvement of interobserver reproducibility of adhesion scoring systems. *Fertil Steril* 62, 984–988.
53. Gemmati, D. et al. DNA-array of gene variants in venous leg ulcers: detection of prognostic indicators. *Journal of vascular surgery* 50, 1444–1451.
54. Gemmati, D. et al. Influence of gene polymorphisms in ulcer healing process after superficial venous surgery. *Journal of vascular surgery* 44, 554–562.
55. Gemmati, D. et al. Factor XIII V34L polymorphism modulates the risk of chronic venous leg ulcer progression and extension. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society* 12, 512–517.
56. Tognazzo, S. et al. Prognostic role of factor XIII gene variants in nonhealing venous leg ulcers. *Journal of vascular surgery* 44, 815–819.
57. Tisato, V. et al. Gene-gene interactions among coding genes of iron-homeostasis proteins and APOE-alleles in cognitive impairment diseases. *PloS one* 13, e0193867.
58. Gemmati, D. et al. Factor XIII A-V34L and factor XIII B-H95R gene variants: effects on survival in myocardial infarction patients. *Molecular medicine* 13, 112–120.
59. Kaminski, P. et al. The usefulness of laparoscopy and hysteroscopy in the diagnostics and treatment of infertility. *Neuro endocrinology letters* 27, 813–817 (2006).
60. Sawada, T., Nishizawa, H., Nishio, E. & Kadowaki, M. Postoperative adhesion prevention with an oxidized regenerated cellulose adhesion barrier in infertile women. *The Journal of reproductive medicine* 45, 387–389 (2000).
61. Swank, D. J. et al. Laparoscopic adhesiolysis in patients with chronic abdominal pain: a blinded randomised controlled multi-centre trial. *Lancet* 361, 1247–1251 (2003).

62. Mazzetti, C. H., Serinaldi, F., Lebrun, E. & Lemaitre, J. Early laparoscopic adhesiolysis for small bowel obstruction: retrospective study of main advantages. *Surgical endoscopy* 32, 2781–2792.
63. Torres-De La Roche LA, Campo R, Devassy R, Di Spiezio Sardo A, Hooker A, Koninckx P, Urman B, Wallwiener M, De Wilde RL. Adhesions and Anti-Adhesion Systems Highlights. *Facts Views Vis Obgyn.* 2019 Jun;11(2):137-149. PMID: 31824635; PMCID: PMC6897521.
64. Wieser, F. et al. Interleukin-1 receptor antagonist polymorphism in women with peritoneal adhesions. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology* 109, 1298–1300 (2002).
65. Erdogan, E., Celayir, S., Eroglu, E. & Yilmaz, E. Te relation between human leukocyte antigen (HLA) distribution and intestinal obstruction and adhesions in childhood: preliminary report. *Pediatric surgery international* 16, 374–376 (2000).
66. Rout, U. K., Saed, G. M. & Diamond, M. P. Expression pattern and regulation of genes difer between fbroblasts of adhesion and normal human peritoneum. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 3, 1, <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-1> (2005).
67. Ambler, D. R. et al. Microarray expression profiling in adhesion and normal peritoneal tissues. *Fertility and sterility* 97(1158–1164), e1151–1154, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.02.001> (2012).