



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2023 00482**

(22) Data de depozit: **04/09/2023**

(41) Data publicării cererii:
28/03/2025 BOPI nr. **3/2025**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICA LASERILOR, PLASMEI ȘI
RADIȚIEI-INFLPR, STR.ATOMIȘTILOR
NR.409, MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **DINCĂ VALENTINA, STR.MĂRĂȘEȘTI,
NR.12, BL.B4, SC.2, AP.22, MĂGURELE, IF,
RO;**

• **NISTORESCU SIMONA, STR.MIRĂSLĂU
NR.39, MĂGURELE, IF, RO;**
• **DUMITRESCU NICOLETA,
STR.FLORILOR NR.40, BL.C3, AP.20,
MĂGURELE, IF, RO;**
• **BONCIU ANCA, STR. TINERETULUI,
BL. D3, SC.A, AP.10, ET.2, DRĂGĂȘANI,
VL, RO;**
• **MOLDOVAN ANTONIU, STR.TOLBEI
NR.3, BL.C50, SC.A, AP.19, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RUSEN LAURENȚIU, STR.MĂRĂȘEȘTI,
NR.12, MĂGURELE, IF, RO**

(54) **SUPRAFEȚE ELASTOMERICE MICROSTRUCTURATE
RADIALE POROASE OBTINUTE PRIN REPLICARE
FOLOSIND UN STRAT SACRIFICIAL DE SARE PENTRU
REDUCEREA RĂSPUNSULUI INFLAMATOR ȘI AL ADEZIUNII
BACTERIENE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor suprafețe polimerice microtexturate utilizate ca model de interfață în învelișul siliconic al implanturilor mamare. Procedeu, conform invenției, constă în replicare în poli(dimetilsiloxan) (PDMS) folosind matrițe realizate prin ablație laser asistată de măști cu nivel de gri, combinate cu un strat de sacrificiu constând în microcristale de sare dispersate pe suprafața matriței și îndepărtate

ulterior prin spălare, rezultând suprafețe polimerice cu suprafață poroasă cu unitate repetitivă de tip gradient radial cu rol dual în minimizarea adeziunii de micro-organisme și de atenuare a profilului inflamator.

Revendicări: 5
Figuri: 5



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2023 a 0482
Data depozit	04-09-2023

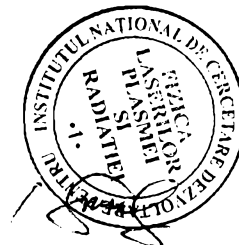
44

Descrierea invenției cu titlul: Suprafete elastomerice microstructurate lineare poroase obtinute prin replicare folosind un strat sacrificial de sare pentru reducerea raspunsului inflamator si al adeziunii bacteriene.

Inventatori: Dinca Valentina, Nistorescu Simona, Bonciu Anca, Dumitrescu Nicoleta, Rusen Laurentiu

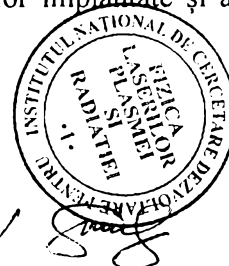
Invenția se referă la obținerea prin replicare a unor noi biointerfete elastomerice din polidimetilsiloxan care au ca si caracteristica principala o microstructurare duala, bazata pe forma specifica de matrici lineare radiale cu suprafata semiporoasa, folosite pentru aplicatii in domeniul implanturilor mamare. Designul acestor structuri s-a bazat pe corelarea efectului topografiei cu raspunsul specific al macrofagelor si al microorganismelor (de ex. raspuns inflamator scazut, adeziune redusa a bacteriilor) ca model de interfata in involisul siliconic al implanturilor mamare. Problema pe care o rezolva inventia de fata este obtinerea pe arie mare a unor noi suprafete polimerice dual structurate care sa nu induca un raspuns inflamator crescut si care sa minimizeze si adeziunea bacteriana la suprafata pe baza topografiei, ajutand astfel la o integrare mai buna si de durata a implanturilor in organismul uman. Noile biointerfete propuse sunt constituite din unitati micrometrice de tip "radial" si microporos obtinute la temperatura camerei, prin metoda replicarii asistate de un strat sacrificial de sare, pe suprafete de minim 1 cm², dar care pot sa ajunga la 100 cm²

Soluția propusă pentru rezolvarea problemei legate de minimizarea raspunsului inflamator si a aderenței bacteriene este **obținerea substraturilor microtexturate** cu unitatea repetitiva de tip gradient radial (cu caracteristici laterale de la 1-70 μm, inaltime pereti 5 μm), realizate prin **replicare in PDMS folosind matrite** obtinute prin ablatie laser asistata de masti de gri, acoperite cu un **strat sacrificial de sare**. Suprafetele obtinute au fost testate folosind următoarele tipuri de celule: macrofage si microorganisme, determinandu-le astfel viabilitatea si evaluandu-le microscopic din punct de vedere al adeziunii pe microstructuri, rezultand un comportament diferit al celor doua tipuri de linii celulare fata de acelasi tip de microstructura. Cantitatea de TNFα eliberata in cazul macrofagelor stimulate cu endotoxine bacteriene a scazut in cazul suprafetelor structurate dual, comparativ cu cea eliberata in prezenta suprafetelor control ceea ce indica minimizarea unui potential inflamator. Imaginile SEM ale bacteriilor atasate pe suprafata



demonstrează abilitatea acestor structuri de a inhiba aderența bacteriană, implicit formarea de biofilm.

Este cunoscut ca implanturile mamare sunt printre cele mai frecvent utilizate dispozitive medicale și prezintă de regulă învelișuri netede sau texturate, umplute cu soluție salină sau gel de silicon [1]. Dintre implanturile pe bază de silicon, poli(dimetilsiloxanul) (PDMS) este cel mai frecvent utilizat silicon în implantologie mamară; datorită numeroaselor sale avantaje, inclusiv rezistență mecanică bună, flexibilitate și biocompatibilitate [2]. Chiar și cu aceste avantaje, efectele secundare cauzate de reacțiile de corpuri străine (FBR) sunt inevitabile, ducând la eșecul implantului [3]. De exemplu, contractura capsulară este o complicație tipică care rezultă din FBR față de implanturile mamare pe bază de PDMS, care apare atunci când capsula fibroasă de collagen se micșorează, se strânge și comprimă implantul. Corectarea contracturii capsulare necesită îndepărtarea chirurgicală (eliberarea) capsulei sau îndepărtarea și eventuala înlocuire a implantului [4,5]. Cu toate acestea, pe lângă contractura capsulară, pacientele care aleg reconstrucția mamară/augmentare mamară, riscă să dezvolte limfom anaplastic cu celule mari (ALCL) asociat implanturilor mamare (*BIA-ALCL*), primul caz identificat datând din 1997 [6]. *BIA-ALCL* este o tumoră malignă neobișnuită care apare în capsula din jurul implanturilor mamare, indiferent de tipul de umplutură [7,8]. În ultimii ani, dovezile au arătat că riscul de a dezvolta *BIA-ALCL* este asociat predominant cu implanturile texturate [9,10]. Astfel, prin urmărirea pe termen lung a unui grup de 3.546 de femei cu implanturi texturate, a fost raportat un risc de *BIA-ALCL* de 1 din 350 de femei expuse [11]. Momentul de debut al bolii variază, majoritatea cazurilor de *BIA-ALCL* fiind detectate de la 7 până la 10 ani după implantare, cazurile sporadice fiind depistate între 2 și 32 de ani după implantare [12,13]. Caracteristicile clinice evidente ale *BIA-ALCL* includ: umflarea sau durerea persistentă în zona implantului mamar, acumularea întârziată de lichid în jurul implantului (observată în 60% din cazuri), prezența unei mase celulare intracapsulare (observată la 17% din cazuri), și atât mase tumorale solide cât și serom în aproximativ 20% din cazuri [14]. Simptomele mai puțin frecvente includ limfadenopatie, erupții cutanate și contracturi capsulare [15]. Cu toate acestea, s-a dovedit că majoritatea cazurilor de *BIA-ALCL* se manifestă ca un serom sau mai rar ca o tumoră solidă între 7 și 10 ani de la implantare [15–17]. O ipoteză emisă e legată de faptul că *BIA-ALCL* este cauzată de **stimularea cronică a sistemului imunitar** din cauza materialelor implantate și a

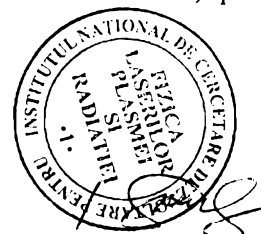


biofilmelor microbiene, precum și a unei posibile predispoziții genetice; cauzele celulare și moleculare ale acesteia nu sunt pe deplin înțelese [18-23].

Cercetările recente au asociat dezvoltarea BIA-ALCL cu utilizarea implanturilor macrotecturate datorită caracteristicilor specifice ale suprafeței texturate și a unui mediu propice factorilor de promovare a bolii furnizați de astfel de implanturi [23]. De fapt, unele studii au sugerat că suprafața macrotecturată a implantului oferă mediul adecvat pentru colonizarea bacteriană, totuși sunt necesare studii suplimentare pentru a confirma astfel de asocieri [24]. În ciuda acestui fapt, una dintre cele mai importante ipoteze este legată de dezvoltarea unui biofilm bacterian asociat implantului. Biofilmul bacterian poate produce inflamație și are ca rezultat activarea cronică a limfocitelor [25-27].

Principalul dezavantaj e legat de faptul ca aceste implanturi induc stimularea antigenică cronică și un răspuns inflamator excesiv ca urmare a infecției bacteriene [25,26]. Într-adevăr, o creștere a infiltrației celulelor T în implanturile texturate a fost raportată ca rezultat al suprafețelor colonizate de bacterii care înconjoară implantul, ducând la infecții care provoacă seroame și contracție capsulară [28]. O ipoteză alternativă este că o componentă a implantului texturat acționează ca un declanșator al bolii, deoarece este recunoscută de sistemul imunitar ca un antigen străin. Mai mult, s-a indicat faptul că limfomul pare asociat exclusiv cu protezele texturate, riscul fiind mai mare pentru implanturile acoperite cu poliuretan sau cu o textură mai robustă [10,14,24]. Unele studii au indicat, de asemenea, că **siliconul (materialul cel mai frecvent utilizat în implanturile mamare [29]) induce o reacție imună locală specifică care implică celulele T-helper activate (Th1/Th17) care provoacă fibroză**. Datorită scăderii funcțiilor locale ale celulelor reglatoare T, se induce o creștere a producției de citokine profibrotice, favorizând astfel dezvoltarea unei astfel de fibroze [25,30]. Deși majoritatea pacienților cu BIA-ALCL au o evoluție clinică, rapoartele de decese atribuite acestei boli subliniază importanța punerii în timp util a unui diagnostic și a unui tratament adecvat cu supraveghere adecvată [31-34].

Prin urmare, se caută soluții pentru minimizarea riscului de apariție a BIA-ALCL prin modificări ale suprafețelor texturate care să inducă o **modulare a reacției** corpului la suprafața implanturilor. **Patentele cu numărul US20120277860A1, US20170049549A1, WO 2017/093528 și WO2020070694A1 [35-38]** fac referire la implanturi mamare și corelarea caracteristicilor de suprafață cu optimizarea integrării sau a „personalizării” acestora, prin



folosirea de materiale variate (ex. poliuretan, poliuretan/uree, acid poliglicolic, policaprolactona sau un amestec al acestora, compusi naturali: agaroza, alginat, chitosan, colagen, fibrina, gelatina, acid hialuronic).

Texturarea specifica si permanentă a suprafeței ar putea fi benefică pentru atenuarea pe termen lung a infectiilor microbiene si a raspunsului inflamator cronic. In acest context, folosirea de interfete spicific texturate de PDMS- poate reprezenta o varianta fiabila pentru obtinerea de biointerfete adecvate cerintelor capsulelor siliconice ale implanturilor mamare. Brevetele US20120277860A1 si 10912636 descriu modalitati de obtinere a suprafetelor texturate intr-un mod aleatoriu, vizand in acelasi timp un raspuns celular imbunatatit comparativ cu cele netede sau texturate existente in comert [35,36].

Printre metodele de obtinere de suprafete structurate de PDMS, replicarea utilizand diverse tipuri de matrite reprezinta una dintre opțiunile promițătoare pentru realizarea strategiei de biomimetism necesara in cazul majoritatii implanturilor. In contextul eforturilor facute pentru evitarea sau minimizarea adeziunii microorganismelor, trebuie luat in considerare mecanismul de ucidere prin contact, unele dintre suprafețele bactericide obținute constand de obicei din caracteristici în aceeași ordine de marire ca bacteriile, aceste topografii biomimetice, bazându-se pe designul inspirat de cicade, frunza de lotus, pielea de rechin, gecko, aripi de libelule, fluturi[39-42].

Scopul inventiei este de a obtine noi biointerfete elastomerice din polidimetilsiloxan avand ca si caracteristica principala o microstructurare duala. Aceasta microstructurare duala este bazata pe forma specifica de matrici lineare radiale cu suprafata poroasa, care vizeaza un raspuns inflamator scazut, adeziune redusa a bacteriilor pentru a putea fi folosite ca model de interfata in invelisul siliconic al implanturilor mamare.

Problema pe care o rezolva inventia de fata este obtinerea pe arie mare a unor noi suprafete polimerice dual structurate care sa nu induca un raspuns inflamator crescut si care sa minimizeze si adeziunea bacteriana la suprafata pe baza topografiei, ajutand astfel la o integrare mai buna si de durata a implanturilor in organismul uman. Noile biointerfete propuse sunt constituite din unitati micrometrice de tip "radial" si microporos obtinute la temperatura camerei, prin metoda replicarii asistate de un strat sacrificial de sare, pe suprafete de minim 1 cm², dar care pot sa ajunga la 100 cm²



Soluția propusă pentru rezolvarea problemei legate de minimizarea răspunsului inflamator și a aderenței bacteriene este **obținerea substraturilor microtexturate** cu unitatea repetitivă de tip gradient radial (cu caracteristici laterale de la 1-70 μm , înălțime pereti 5 μm), realizate prin **replicare în PDMS folosind matrite** obținute prin ablație laser asistată de masti de gri, acoperite cu un **strat sacrificial de sare**.

Eficiența microstructurilor a fost testată prin analiza răspunsului macrofagelor și bacteriilor la caracteristicile de suprafață.

Suprafețele texturate, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

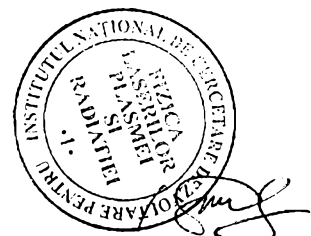
- Se pot obține rapid, în mod reproductibil și în cantități mari și pe suprafețe mari
- **împiedică aderența microorganismelor, implicit a formării biofilmelor;**
- **în cazul** macrofagelor stimulate cu endotoxine bacteriene, secreția de TNF α scade pe suprafețele dual structurate, ceea ce indică posibilă modulare a unui potențial inflamator.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție se referă la suprafețele neadecvate ale implanturilor mamare care pot produce un răspuns inflamator acut. Abordarea acestui brevet pentru rezolvarea acestei probleme constă în obținerea de noi suprafețe polimerice, cu caracteristici topografice bine definite bazate **pe forma specifică de matrici lineare radiale cu suprafața poroasă**.

Conform metodei de obținere a substraturilor microtexturate dual cu unitatea repetitivă radială cu 5 μm adâncime, acestea au fost realizate prin replicare în PDMS asistată de un strat sacrificial de sare și folosind matrite obținute prin ablație laser cu masti. Eficiența microstructurilor a fost testată analizând adeziunea macrofagelor și a microorganismelor pe suprafețele texturate.

În urma testelor putem concluziona:

- substraturi microtexturate specific au fost obținute prin metoda replicării folosind matrite obținute prin ablație laser asistată de masti cu nivel de gri, combinate cu un strat de sacrificiu constând în microcristale de sare dispersate pe suprafața matritei și îndepărtate ulterior prin spalare;
- substraturile polimerice obținute au potențial inflamator scăzut comparativ cu controlul, și inhibă adeziunea bacteriană.



Se da in continuare, un exemplu de realizare a substraturilor microtexturate dual:

Metoda de obtinere a substraturilor microtexturate de tip linear microporos descrisa in **Desenul 1** (Desenul 1: Schema sistemului de obtinere de substraturi de PDMS microstructurat sub forma lineara microporoasa), presupune urmatoarele etape:

1. Obtinerea de matrite de replicare a fost realizata prin ablatie laser asistata de masti cu nivel de gri. Setup-ul experimental contine un laser cu excimer KrF (Exitech, PPM-601E Gen 6 Instrument)(1), (20ns puls, 248nm lungimea de unda si rata de repetitie de 50Hz). Fasciculul laser a fost directionat catre masca (2), si printr-un sistem de lentile (3) a fost focalizat pe un substrat de polycarbonat (4). A fost folosita o fluenta de 450 mJ/cm^2 , un numar de 30 de pulsuri micro-modele lineare fiind generate pe substratul de polycarbonat folosit ca matrita (4).
2. Probele de polycarbonat au fost curatate in baia cu ultrasunete timp de 10 minute, secvential, în alcool izopropilic (IPA) si apa ultrapura, urmata de uscare. Sare (cu dimensiuni cristale de 20-100 microni) a fost depusa pe suprafetele texturate. Excesul a fost indepartat prin presare usoara cu o banda adeziva de hartie.
3. Suprafetele finale texturate (11) s-au obtinut prin turnarea PDMS-ului (10)-(Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit; Dow Corning) (1:10) pe matrita de polycarbonat (4), respectiv matrita de polycarbonat acoperita de un strat de sare (5) si pastrarea acestuia timp de 48h la temperatura camerei.
4. O data finalizat procesul de polimerizare, replicile au fost desprinse si spalate timp de 2 h in baia de ultrasunete.

După finalizarea protocolului de lucru, probele de PDMS obținute au fost vizualizate prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) pentru a confirma replicarea matriței (desen 2), dar si a porozitatii induse de cristalele de sare. Analiza SEM detaliata a probelor structurate s-a efectuat cu ajutorul unui microscop electronic de baleiaj JSM-531, folosind 5 kV, putandu-se observa obtinerea de microstructuri cu forme bine definite, pe arie mare, fara prezenta defectelor pe suprafata. Suprafetele obtinute folosind matritele texturate cu laser respecta design-ul acestora, fara a prezenta defecte pe suprafata, asa cum se poate observa in Desenul 2-(Desen 2: Imagini de microscopie electronică de baleiaj ale structurilor de suprafață PDMS structurat cu si fara strat sacrificial de sare.



Desenul 3 (Desen 3: Curbe forță vs. distanță înregistrate folosind modul de contact AFM pe replici PDMS; Testele au fost efectuate în cinci zone diferite fiind analizate pe: PDMS neted, PDMS structurat radial, PDMS structurat radial poros) prezintă datele forță versus distanță folosite pentru a estima elasticitatea eșantioanelor. Toate investigațiile AFM au fost efectuate folosind un AFM XE100 de la Park Systems, Suwon, Coreea de Sud, în condiții ambientale. Flexibilitatea elastică a probelor PDMS și aderența vârfului AFM la suprafețele PDMS au fost determinate prin măsurători de forță versus distanță, în cinci puncte diferite, toate alese aleatoriu. Au fost folosite vârfuri de siliciu cu o frecvență de rezonanță de aproximativ 70 kHz și o constantă elastică de $2 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$. Se știe că manipularea elasticității sau topografiei substratului ar putea fi utilizată pentru a promova proliferarea și diferențierea celulară controlată [43-44]. Studiile anterioare au arătat că o serie de procese celulare, inclusiv aderența, migrarea și proliferarea [43] ar putea fi influențate de substratul însuși pentru a determina soarta celulei. Măsurătorile AFM în modul contact, ale forței vs. distanță și aderența vârf-substrat au fost evaluate în punctele superficiale ale fiecărui substrat, evidențiind probele PDMS obținute prin texturarea cu strat sacrificial de sare ca fiind cele ce dețin cele mai semnificative forțe de adeziune. De asemenea, rugozitatea acestor probe este mai mare comparativ cu cea a celorlalte suprafețe.

Tabel . Forțele de desprindere și energiile de adeziune ale probelor PDMS.

Material	Forță de desprindere (10^{-9} N)	Energie de adeziune (10^{-18} J)
PDMS neted	5.0	344.2
PDMS radial	4.31	229.6
PMDS radial poros	9.7	648.3

Hidrofilicitatea/hidrofobicitatea definită prin măsurarea unghiului de contact afectează orientarea și conformația proteinelor adsorbite și, prin urmare, afectează diferențierea celulară. Unghiul de contact pe care îl face o picătură de apă lichidă cu o suprafață PDMS oferă cea mai simplă și mai elementară măsură a hidrofobicității sale. Suprafețele texturate sunt caracterizate de un profil hidrofobic, unghiul de contact crescând cu peste 10-20% în cazul texturării cu sare.

(103 pentru PDMS, 118 pentru PDMS structurat). Determinarea parametrilor rugozității a fost realizată prin profilometrie de contact. Valorile obținute pentru parametrii de rugozitate Ra și Rq au aratat ca microtopografiile create pe suprafețele de PDMS cresc rugozitatea biomaterialului. Astfel, au fost evidențiate modificări ale valorilor rugozității suprafeței de la 0.021 μm (Ra) și 0.032 μm (Rq) pentru PDMS neted până la Sa 13.82 μm și Sq 16.3 μm pentru proba dual structurata.

Protocol de validare a microstructurilor obtinute prin replicare in analiza interactiei cu celule. Raspunsul caracteristic al suprafetelor la celule a fost obtinut urmarind pasii de mai jos:

1. Cultivarea celulelor RAW264.7. Inainte de utilizarea in experimente in vitro, probele au fost supuse sterilizarii la temperatura camerei cu solutie de penicilina-streptomicina 1% in PBS timp de 20 de minute, cu efect germicid, pentru prevenirea contaminarii bacteriene.

Citotoxicitatea probelor a fost evaluată prin investigarea viabilității celulare după 24 și 72 de ore de la expunerea la suprafețele de PDMS, precum și prin evidențierea modificărilor citomorfologice induse de microtopografia prin evidențierea citoscheletului celular după 24 și 72 de ore de la tratament. Experimentele derulate au fost realizate atât în condiții pro-inflamatorii (+LPS), cât și standard (-LPS) de cultivare.

2. Testarea ratei de supraviețuire a celulelor macrofage LIVE/DEAD. Pentru a studia rata de supraviețuire a celulelor pe substraturile replicate, a fost evaluată viabilitatea RAW264.7 la 24 și 72 de ore după însămânțarea macrofagelor prin testul LIVE/DEAD. Monostraturile celulare aderate pe suprafețele de PDMS microtexturate au fost spălate cu mediu de cultură fără ser și colorate cu calceină AM și homodimer de etidiu timp de 10 minute la întuneric, pentru a investiga calitativ viabilitatea celulară. Celulele vii emit o fluorescență verde datorită hidrolizei esterului de calceină AM la calceină, în timp ce celulele moarte emit o fluorescență roșie din cauza legării în ADN celular a homodimerului de etidiu, în celulele cu membrane nucleare compromise. Rezultatele colorării au fost achiziționate cu ajutorul unui microscop de fluorescență.

3. Evaluarea modificărilor citomorfologice induse de substraturile de PDMS prin microscopie de fluorescență. Evaluarea capacității microtopografiilor de PDMS de a



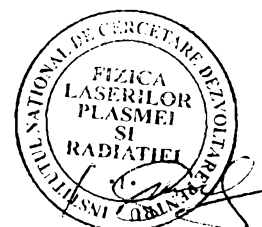
induce modificări morfologice în culturile de macrofage murine a fost realizată prin evidențierea filamentelor de actină din compoziția citoscheletului, precum și prin marcarea fluorescentă a nucleilor.

4. Însămânțarea tulpinii și prepararea suspensiei bacteriene

Au fost utilizate tulpini standard de *Pseudomonas Aeruginosa*. Însămânțarea tulpinilor s-a realizat prin descărcarea ansei bacteriologice de unică folosință pe mediul de cultură agar nutritiv (PCA – Plate Count Agar), scopul cultivării fiind de a obține cultură pură. Condițiile de incubare au fost: 37°C, 5% CO₂, timpul de incubare 24 de ore. Probele de PDMS au fost tăiate cu un bisturiu steril la o dimensiune de 1x1 cm și au fost sterilizate la UV timp de 15 minute pe fiecare parte. După sterilizare, probele au fost mutate în plăci cu 24 de godeuri, iar peste materiale au fost pipetați 600 μL/godeu din suspensia bacteriană preparată. În final, plăcile au fost incubate până la 48 ore la 37°C pentru a permite dezvoltarea de biofilme pe suprafețele de interes. Pentru evidențierea efectului anti-biofilm a suprafețelor de interes, substraturile au fost fixate în diluții seriale de etanol (35%-100%) timp de 15 minute după 2 zile de creștere bacteriană și vizualizate prin SEM.

5. Microscopia SEM. Efectele induse de suprafața biomaterialelor asupra morfologiei macrofagelor au fost investigate prin SEM, utilizând Inspect S Electron Scanning Microscope (FEI Company). Materialele conținând celule aderente au fost fixate cu glutaraldehidă 2,5% în tampon fosfat (PBS) timp de 20 min, apoi deshidratate și uscate cu etanol și HMDS (hexamethyldisilazane) și uscate în hotă timp de 24 ore.

Se poate observa din Desenul 4 (Desen 4-Imagini de fluorescență ale celulelor macrofage incubate în condiții de stimulare cu LPS) că la 72 de ore, imaginile de fluorescență indică prezența predominantă a celulelor viabile marcate verde fluorescent, în prezența stimulului pro-inflamator (+LPS), atât pe suprafața de control cât și pe cea microstructurată, iar în urma marcării actinei citoschelelate cu faloidină, la 72 de ore post-însămânțare, celulele RAW 264.7 cultivate în condiții pro-inflamatorii (+LPS) au prezentat dimensiuni mult mai mari și numeroase filopodii pe suprafețele de control comparativ cu cele structurate, acest comportament morfologic fiind caracteristic unui fenotip activat pro-inflamator și migrator.



În desenul 5 (Desen 5- Imagini SEM ale bacteriilor incubate pe probele dual structurate), informațiile legate de morfologia celulară a bacteriilor la 48 ore afectate de microstructurare demonstrează abilitatea acestora de a împiedica formarea de biofilm. Pentru vizualizarea biofilmelor formate pe suprafețele de interes prin SEM, probele au fost fixate în metanol timp de 15 minute și luate la uscat peste noapte.

Eficiența suprafețelor de PDMS împotriva *P. aeruginosa* care face parte din grupul bacteriilor Gram negative, a arătat o reducere a numărului de UFC/mL ($2,5 \times 10^4$ UFC/mL PDMS texturat comparativ cu 2×10^5 UFC/mL pentru controlul pozitiv). Imaginile SEM arată o diferență semnificativă între suprafața Control și cea microstructurată pe baza de PDMS, pe suprafața de Control fiind observată formarea de biofilm în timp ce suprafața dual structurată prezintă doar câteva bacterii izolate, și nu sub formă de biofilm.

În urma analizelor efectuate pe suprafețele microstructurate obținute și a testelor efectuate cu 2 tipuri de celule implicate în interacția implant mamar-organism, putem concluziona:

- Materialele pe baza de PDMS structurate dual - favorizează aderența macrofagelor la un nivel mai mic decât cel al controlului
- Celulele macrofage se atasează pe suprafețele testate și prezintă un aspect morfologic adaptat la topologia suprafeței materialelor pe baza de PDMS.
- Nivelul de citochine TNF- α măsurat atestă absența unui efect inflamator pentru structurile lineare poroase, nivelul de TNF- α fiind nesemnificativ față de CTRL (celule crescute pe coverslip și tratate cu LPS).
- Materialele pe baza de PDMS structurate dual - nu favorizează aderența microorganismelor.



Referinte bibliografice:

1. Health, C. for D. and R. Medical Device Reports of Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma. FDA 2022.
2. Daniels, A. Silicone Breast Implant Materials. Swiss Med Wkly 2012, doi:10.4414/smw.2012.13614.
3. Shaik, I.H.; Gandrapu, B.; Gonzalez-Ibarra, F.; Flores, D.; Matta, J.; Syed, A.K. Silicone Breast Implants: A Rare Cause of Pleural Effusion. Case Reports in Pulmonology 2015, 2015, 1–3, doi:10.1155/2015/652918.
4. Dolwick, M.F.; Aufdemorte, T.B. Silicone-Induced Foreign Body Reaction and Lymphadenopathy after Temporomandibular Joint Arthroplasty. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1985, 59, 449–452, doi:10.1016/0030-4220(85)90079-9.
5. Headon, H.; Kasem, A.; Mokbel, K. Capsular Contracture after Breast Augmentation: An Update for Clinical Practice. Arch Plast Surg 2015, 42, 532–543, doi:10.5999/aps.2015.42.5.532.
6. Keech, J.A.; Creech, B.J. ANAPLASTIC T-CELL LYMPHOMA IN PROXIMITY TO A SALINE-FILLED BREAST IMPLANT: Plastic & Reconstructive Surgery 1997, 100, 554,555, doi:10.1097/00006534-199708000-00065.
7. Di Napoli, A.; Pepe, G.; Giarnieri, E.; Cippitelli, C.; Bonifacino, A.; Mattei, M.; Martelli, M.; Falasca, C.; Cox, M.C.; Santino, I.; et al. Cytological Diagnostic Features of Late Breast Implant Seromas: From Reactive to Anaplastic Large Cell Lymphoma. PLoS One 2017, 12, e0181097, doi:10.1371/journal.pone.0181097.
8. Nava, M.B.; Adams, W.P.; Botti, G.; Campanale, A.; Catanuto, G.; Clemens, M.W.; Del Vecchio, D.A.; De Vita, R.; Di Napoli, A.; Hall-Findlay, E.; et al. MBN 2016 Aesthetic Breast Meeting BIA-ALCL Consensus Conference Report. Plast Reconstr Surg 2018, 141, 40–48, doi:10.1097/PRS.0000000000003933.
9. Doren, E.L.; Miranda, R.N.; Selber, J.C.; Garvey, P.B.; Liu, J.; Medeiros, L.J.; Butler, C.E.; Clemens, M.W. U.S. Epidemiology of Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma. Plast Reconstr Surg 2017, 139, 1042–1050, doi:10.1097/PRS.0000000000003282.

10. de Boer, M.; van Leeuwen, F.E.; Hauptmann, M.; Overbeek, L.I.H.; de Boer, J.P.; Hijmering, N.J.; Sernee, A.; Klazen, C.A.H.; Lobbes, M.B.I.; van der Hulst, R.R.W.J.; et al. Breast Implants and the Risk of Anaplastic Large-Cell Lymphoma in the Breast. *JAMA Oncol* 2018, 4, 335–341, doi:10.1001/jamaoncol.2017.4510.
11. Cordeiro, P.G.; Ghione, P.; Ni, A.; Hu, Q.; Ganesan, N.; Galasso, N.; Dogan, A.; Horwitz, S.M. Risk of Breast Implant Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma (BIA-ALCL) in a Cohort of 3546 Women Prospectively Followed Long Term after Reconstruction with Textured Breast Implants. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2020, 73, 841–846, doi:10.1016/j.bjps.2019.11.064.
12. Aladily, T.N.; Medeiros, L.J.; Amin, M.B.; Haideri, N.; Ye, D.; Azevedo, S.J.; Jorgensen, J.L.; de Peralta-Venturina, M.; Mustafa, E.B.; Young, K.H.; et al. Anaplastic Large Cell Lymphoma Associated with Breast Implants: A Report of 13 Cases. *Am J Surg Pathol* 2012, 36, 1000–1008, doi:10.1097/PAS.0b013e31825749b1.
13. Clemens, M.W.; Medeiros, L.J.; Butler, C.E.; Hunt, K.K.; Fanale, M.A.; Horwitz, S.; Weisenburger, D.D.; Liu, J.; Morgan, E.A.; Kanagal-Shamanna, R.; et al. Complete Surgical Excision Is Essential for the Management of Patients With Breast Implant-Associated Anaplastic Large-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2016, 34, 160–168, doi:10.1200/JCO.2015.63.3412.
14. Clemens, M.W.; Nava, M.B.; Rocco, N.; Miranda, R.N. Understanding Rare Adverse Sequelae of Breast Implants: Anaplastic Large-Cell Lymphoma, Late Seromas, and Double Capsules. *Gland Surg* 2017, 6, 169–184, doi:10.21037/gs.2016.11.03.
15. Clemens, M.W.; Brody, G.S.; Mahabir, R.C.; Miranda, R.N. How to Diagnose and Treat Breast Implant–Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma: Plastic and Reconstructive Surgery 2018, 141, 586e–599e, doi:10.1097/PRS.0000000000004262.
16. Kricheldorf, J.; Fallenberg, E.M.; Solbach, C.; Gerber-Schäfer, C.; Rancsó, C.; Fritschen, U. von Breast Implant-Associated Lymphoma. *Dtsch Arztebl Int* 2018, 115, 628–635, doi:10.3238/arztebl.2018.0628.
17. Clemens, M.W.; Jacobsen, E.D.; Horwitz, S.M. 2019 NCCN Consensus Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma (BIA-ALCL). *Aesthet Surg J* 2019, 39, S3–S13, doi:10.1093/asj/sjy331.

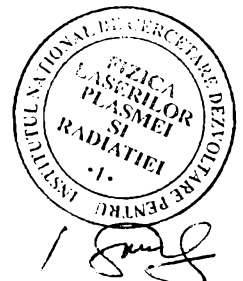
18. Lee, J.S.; Shin, B.H.; Yoo, B.Y.; Nam, S.-Y.; Lee, M.; Choi, J.; Park, H.; Choy, Y.B.; Heo, C.Y.; Koh, W.-G. Modulation of Foreign Body Reaction against PDMS Implant by Grafting Topographically Different Poly(Acrylic Acid) Micropatterns. *Macromol Biosci* 2019, 19, e1900206, doi:10.1002/mabi.201900206.
19. Swerdlow, S.H.; Campo, E.; Pileri, S.A.; Harris, N.L.; Stein, H.; Siebert, R.; Advani, R.; Ghielmini, M.; Salles, G.A.; Zelenetz, A.D.; et al. The 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid Neoplasms. *Blood* 2016, 127, 2375–2390, doi:10.1182/blood-2016-01-643569.
20. Falini, B.; Martelli, M.P. Anaplastic Large Cell Lymphoma: Changes in the World Health Organization Classification and Perspectives for Targeted Therapy. *Haematologica* 2009, 94, 897–900, doi:10.3324/haematol.2009.008250.
21. Laurent, C.; Delas, A.; Gaulard, P.; Haioun, C.; Moreau, A.; Xerri, L.; Traverse-Glehen, A.; Rousset, T.; Quintin-Roue, I.; Petrella, T.; et al. Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma: Two Distinct Clinicopathological Variants with Different Outcomes. *Ann Oncol* 2016, 27, 306–314, doi:10.1093/annonc/mdv575.
22. Taylor, C.R.; Siddiqi, I.N.; Brody, G.S. Anaplastic Large Cell Lymphoma Occurring in Association with Breast Implants: Review of Pathologic and Immunohistochemical Features in 103 Cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013, 21, 13–20, doi:10.1097/PAI.0b013e318266476c.
23. Turner, S.D. The Cellular Origins of Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma (BIA-ALCL): Implications for Immunogenesis. *Aesthet Surg J* 2019, 39, S21–S27, doi:10.1093/asj/sjy229.
24. Loch-Wilkinson, A.; Beath, K.J.; Knight, R.J.W.; Wessels, W.L.F.; Magnusson, M.; Papadopoulos, T.; Connell, T.; Lofts, J.; Locke, M.; Hopper, I.; et al. Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma in Australia and New Zealand: High-Surface-Area Textured Implants Are Associated with Increased Risk. *Plast Reconstr Surg* 2017, 140, 645–654, doi:10.1097/PRS.00000000000003654.
25. Hu, H.; Johani, K.; Almatroudi, A.; Vickery, K.; Van Natta, B.; Kadin, M.E.; Brody, G.; Clemens, M.; Cheah, C.Y.; Lade, S.; et al. Bacterial Biofilm Infection Detected in Breast Implant-Associated Anaplastic Large-Cell Lymphoma: Plastic and Reconstructive Surgery 2016, 137, 1659–1669, doi:10.1097/PRS.00000000000002010.

26. Hu, H.; Jacombs, A.; Vickery, K.; Merten, S.L.; Pennington, D.G.; Deva, A.K. Chronic Biofilm Infection in Breast Implants Is Associated with an Increased T-Cell Lymphocytic Infiltrate: Implications for Breast Implant-Associated Lymphoma. *Plast Reconstr Surg* 2015, 135, 319–329, doi:10.1097/PRS.0000000000000886.
27. Campanale, A.; Boldrini, R.; Marletta, M. 22 Cases of Breast Implant-Associated ALCL: Awareness and Outcome Tracking from the Italian Ministry of Health. *Plast Reconstr Surg* 2018, 141, 11e–19e, doi:10.1097/PRS.00000000000003916.
28. Adams, W.P.; Culbertson, E.J.; Deva, A.K.; R Magnusson, M.; Layt, C.; Jewell, M.L.; Mallucci, P.; Hedén, P. Macrot textured Breast Implants with Defined Steps to Minimize Bacterial Contamination around the Device: Experience in 42,000 Implants. *Plast Reconstr Surg* 2017, 140, 427–431, doi:10.1097/PRS.00000000000003575.
29. Kang, S.; Sutthiwanjampa, C.; Heo, C.; Kim, W.; Lee, S.-H.; Park, H. Current Approaches Including Novel Nano/Microtechniques to Reduce Silicone Implant-Induced Contracture with Adverse Immune Responses. *IJMS* 2018, 19, 1171, doi:10.3390/ijms19041171.
30. Wolfram, D.; Dolores, W.; Rainer, C.; Christian, R.; Niederegger, H.; Harald, N.; Piza, H.; Hildegunde, P.; Wick, G.; Georg, W. Cellular and Molecular Composition of Fibrous Capsules Formed around Silicone Breast Implants with Special Focus on Local Immune Reactions. *J Autoimmun* 2004, 23, 81–91, doi:10.1016/j.jaut.2004.03.005.
31. Carty, M.J.; Pribaz, J.J.; Antin, J.H.; Volpicelli, E.R.; Toomey, C.E.; Farkash, E.A.; Hochberg, E.P. A Patient Death Attributable to Implant-Related Primary Anaplastic Large Cell Lymphoma of the Breast. *Plast Reconstr Surg* 2011, 128, 112e–118e, doi:10.1097/PRS.0b013e318221db96.
32. Rondón-Lagos, M.; Rangel, N.; Camargo-Villalba, G.; Forero-Castro, M. Biological and Genetic Landscape of Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma (BIA-ALCL). *European Journal of Surgical Oncology* 2021, 47, 942–951, doi:10.1016/j.ejso.2020.10.029.
33. WO 2017/093528- Medical implants and methods of preparation thereof crossreference to related applications -2019
34. WO2020070694A1- Scaffolding for implantable medical devices and methods of use, 2020

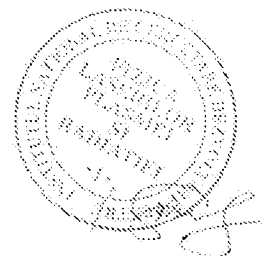
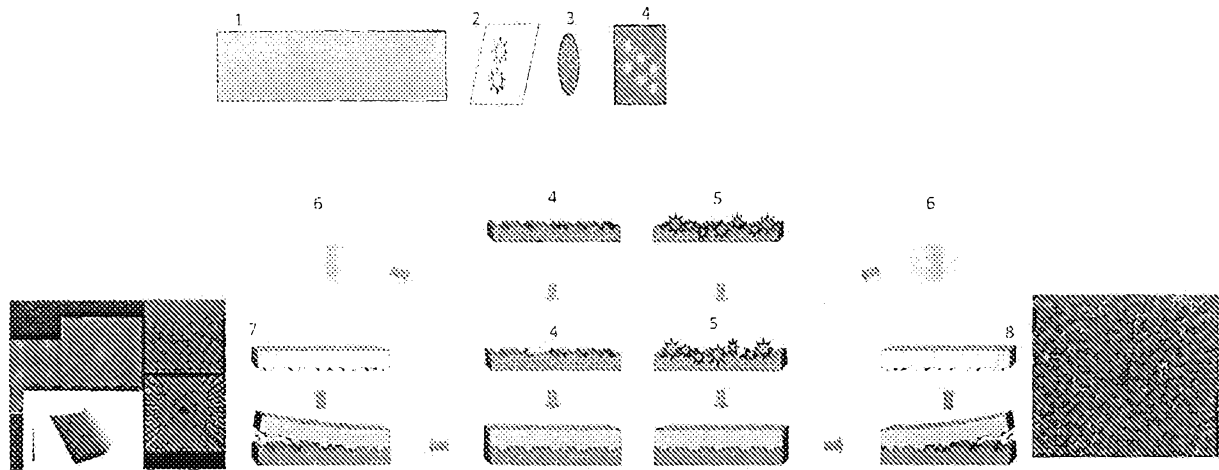
35. Byrne, M.K., Miellet, S., McGlinn, A. et al. The drivers of antibiotic use and misuse: the development and investigation of a theory driven community measure. *BMC Public Health* 19, 1425 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7796-8>.
36. US20120277860A1 -Lightweight breast implant material, 2012
37. Brevet 10912636 -Textured surfaces for breast implants
38. Victor, A.H., Apolónia, S., Ribeiro, J.G., Araújo, F.F., Bragança, Portugal, Apolónia, C.S., Cefet, Reis, R.C., Janeiro, R.D., & Brasil (2019). Study of PDMS characterization and its applications in biomedicine: A review. *Journal of Mechanical Engineering and Biomechanics*.
39. Lee, S. W., Phillips, K. S., Gu, H., Kazemzadeh-Narbat, M., & Ren, D. (2021). How microbes read the map: Effects of implant topography on bacterial adhesion and biofilm formation. *Biomaterials*, 268, 120595. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120595>
40. Zheng, S., Bawazir, M., Dhall, A., Kim, H., He, L., Heo, J., & Hwang, G. (2021). Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 643722. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.643722>}.
41. Chien, H. W., Chen, X. Y., Tsai, W. P., and Lee, M. (2020). Inhibition of biofilm formation by rough shark skin-patterned surfaces. *Colloids Surf. B Biointerf.* 186:110738. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110738
42. Ding, A. M., Palmer, R. J. Jr., Cisar, J. O., and Kolenbrander, P. E. (2010). Shear-enhanced oral microbial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1294–1297. doi: 10.1128/aem.02083-09
43. Wang, H.B.; Dembo, M.; Wang, Y.L. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000, 279, C1345–C1350.;
44. Pelham, R.J., Jr.; Wang, Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 1997, 94, 13661–13665].

Revendicari

1. Suprafetele finale texturate **sunt caracterizate prin aceea ca pot fi obtinute** matrici de structuri lineare radiale poroase cu rol dual in minimizarea adeziunii de microorganisme si de atenuare a profilului inflamator.
2. Noile structuri obținute în condițiile revendicării 1, **sunt caracterizate** de forțe de adeziune crescute, rugozitate si hidrofobicitate crescute fata de suprafetele nestructurate
3. **Structurile obținute în condițiile revendicării 1 sunt caracterizate prin aceea ca permit** atasarea celulelor macrofage caracterizate de un aspect morfologic adaptat la topologia suprafetei materialelor pe baza de PDMS
4. **Structurile obținute în condițiile revendicării 1 sunt caracterizate prin aceea ca nivelul** de citochine TNF- α masurat atesta absenta unui efect inflamator pentru structurile lineare porosase, nivelul de TNF- α fiind nesemnificativ fata de CTRL (celule crescute pe coverslip si tratate cu LPS).
5. **Structurile obținute în condițiile revendicării 1 sunt caracterizate prin aceea ca nu** favorizeaza aderarea microorganismelor si implicit formarea de biofilm.

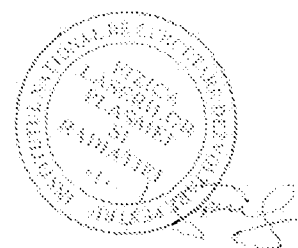
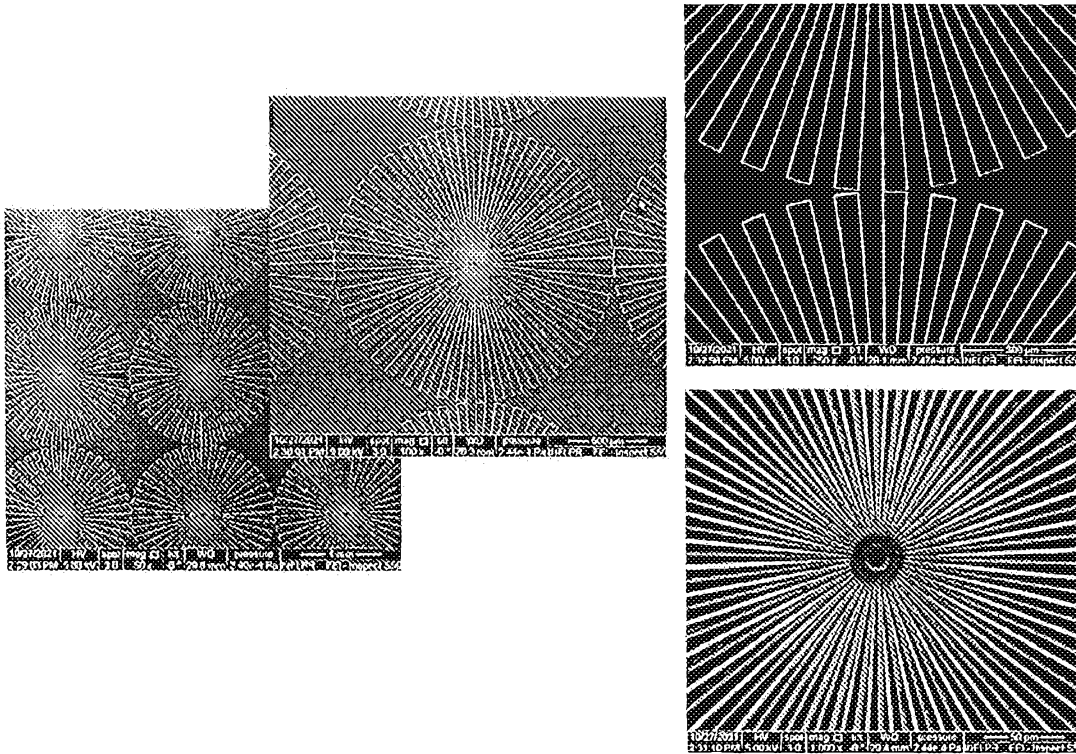


Desen 1



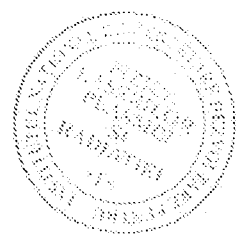
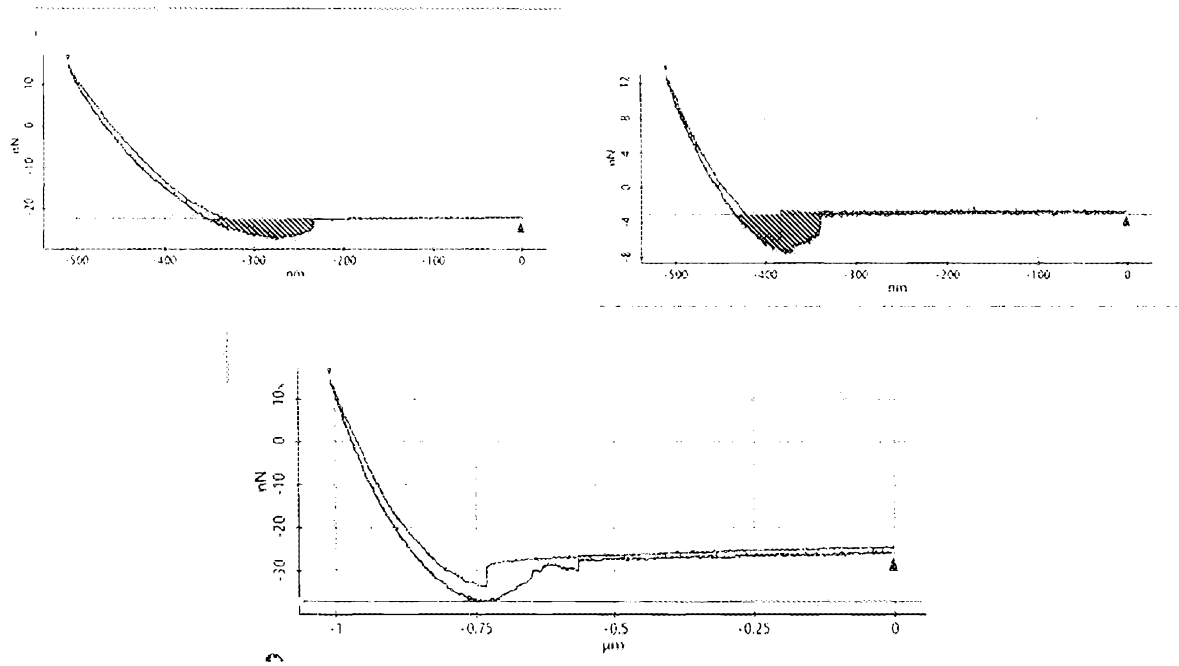
af

Desen 2



136

Desen 3



Desen 4.

