

AUTOREFERAT

WYKAZ DOROBKU HABILITACYJNEGO

OBSZAR NAUK TECHNICZNYCH

Magdalena Przybyło

**Katedra Inżynierii Biomedycznej
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wroclawska**

Obszar wiedzy: **Obszar Nauk Technicznych**

Dziedzina nauki: **Nauki Techniczne**

Dyscyplina naukowa: **Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna**

Researcher ID : Y-8014-2018

ORCID: 0000-0002-0216-6456

Scopus Author ID: 22939021500

Spis treści

1. AUTOREFERAT	5
1. Imię i nazwisko	5
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy miejsca i roku ich uzyskania	5
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:	5
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):	6
a. Tytuł osiągnięcia naukowego:	7
b. Publikacje lub inne prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:	7
c. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	11
1. Wprowadzenie	12
2. Wstęp	14
2.1 Transport wody w poprzek błon lipidowych w układach biologicznych	14
2.2 Zjawisko samoagregacji lipidów i jego rola w formowaniu liposomów	16
2.3 Znaczenie transportu wody przez błony w technologii kierowanych nośników leków	17
3. Ogólny cel prac badawczych	18
3.1 Opracowanie metody oznaczania transportu wody w błonach biologicznych	18
3.2 Opracowanie metody oznaczania dyfuzyjnego transportu wody w poprzek dwuwarstwy lipidowej	20
3.3 Wpływ struktury dwuwarstwy lipidowej na transport wody w poprzek błony	26
3.4 Wpływ składu fazy wodnej na transport wody przez błony	27
3.5 Korelacja parametrów mechaniki dwuwarstwy lipidowej z transportem wody	29
4. Podsumowanie i wnioski	30
4.1 Mechanizm transportu wody i jego znaczenie w technologii wytwarzania kierowanych nośników leków	30
4.2 Główne osiągnięcia cyklu naukowo-badawczego	31
5. Obecne projekty i zagadnienia badawcze	32
2. WYKAZ DOROBKU	38
I. Wykaz innych (niewchodzących w skład osiągnięcia wymienionego w pkt 4) opublikowanych prac naukowych oraz wskaźniki dokonań naukowych	38
A. Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC)	38
Po doktoracie:	38
Przed doktoratem:	43
B. Zrealizowane oryginalne osiągnięcie projektowe, konstrukcyjne i technologiczne	44
Po doktoracie	44
C. Udzielone patenty międzynarodowe i krajowe	45
Po doktoracie	45
D. Wynalazki oraz wzory użytkowe i przemysłowe, które uzyskały ochronę i zostały wystawione na międzynarodowych lub krajowych wystawach lub targach	47
E. Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w pkt. I A:	47
Po doktoracie	47

F.	Opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych, ekspertyz, utworów i dzieł artystycznych	47
G.	Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania:	47
H.	Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS)	47
I.	Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS)	47
J.	Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach	48
	Po doktoracie	48
	Przed doktoratem	48
K.	Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową albo artystyczną	49
	Po doktoracie	49
	Przed doktoratem	49
L.	Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencji tematycznych	50
	Po doktoracie	50
	Przed doktoratem	50
II.	Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta	50
A.	Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych	50
	Po doktoracie	50
B.	Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych	51
	Konferencje międzynarodowe po doktoracie:	51
	Artykuły w materiałach konferencji krajowych po doktoracie	52
	Artykuły w materiałach konferencyjnych przed doktoratem	53
C.	Udział w komitetach organizacyjnych międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych	55
D.	Otrzymane nagrody i wyróżnienia inne niż wymienione w pkt I K	55
E.	Udział w konsorcjach i sieciach badawczych	56
F.	Kierowanie projektami realizowanymi we współpracy z naukowcami z innych ośrodków polskich i zagranicznych oraz we współpracy z przedsiębiorcami, innymi niż wymienione w pkt I J	56
G.	Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism	56
H.	Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych	56
I.	Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki	56
J.	Opieka naukowa nad studentami i lekarzami w toku specjalizacji	57
K.	Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego	59
L.	Staże w zagranicznych i krajowych naukowych ośrodkach naukowych lub akademickich	60
M.	Wykonane ekspertyzy lub inne opracowania na zamówienie	61
N.	Udział w zespołach eksperckich i konkursowych	61
O.	Recenzowanie projektów międzynarodowych i krajowych	62
P.	Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych	62

1. AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Magdalena Przybyło

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy miejsca i roku ich uzyskania

Studia doktoranckie: 10/1/2004 — 1/26/2010 na Politechnice Wrocławskiej na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki w Instytucie Fizyki specjalność: Biofizyka

Stopień naukowy: dr nauk fizycznych

Promotor: prof. Marek Langner

Recenzenci: prof. Waław Urbańczyk, prof. Jerzy Dobrucki

Tytuł rozprawy doktorskiej: Wybrane aspekty dynamiki dwuwarstwy lipidowej

Studia magisterskie: 1/9/2003 — 8/31/2004 na Politechnice Wrocławskiej na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki, Kierunek: Fizyka Techniczna, Specjalność: Inżynieria Biomedyczna, Optyka Biomedyczna

Tytuł: mgr inż.

Promotor: prof. Marek Langner

Tytuł pracy magisterskiej: Analiza asocjacji jodku propidyny z oligonukleotydamy w oparciu o efekt gaszenia fluorescencji

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01/03/2014 – **obecnie** Wojewódzki Szpital Specjalistyczny Ośrodek Badawczo-Rozwojowy we Wrocławiu umowa o wolontariat w zakresie kierowania rozwojem Ośrodka, pozyskiwania środków grantowych, planowania doświadczeń

10/1/2012 — **obecnie** Politechnika Wrocławska Wybrzeże Wyspiańskiego 27, Wrocław

Pracownik Naukowo-Dydaktyczny, Katedra Inżynierii Biomedycznej WPPT

Adiunkt / Prowadzenie zajęć dydaktycznych; opracowywanie i realizacja projektów badawczych.

10/1/2010 — **30/09/2012** Politechnika Wrocławska

Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, WPPT

Asystent / Prowadzenie zajęć dydaktycznych; opracowywanie i realizacja projektów badawczych.

10/16/2009 — **9/30/2010** Politechnika Wrocławska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, Wrocław

Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej

Starszy referent / Organizacja pracy laboratorium

5/31/2007 — **9/16/2009** Centrum Badawczo-Rozwojowe Novasome Olsztyńska 5, Wrocław

Koordynator Projektów; planowanie i nadzorowanie projektów badawczych, opracowywanie formułacji farmaceutycznych; projektowanie linii technologicznych do produkcji wyrobów farmaceutycznych; wykonywanie testów in-vitro; analizy fizyczne, fizyko-chemiczne; opracowywanie projektów badawczych. (Centrum Badawczo-Rozwojowe w rozumieniu ustawy)

1/10/2006 — **12/31/2006** Instytut Chemii Fizycznej Czeskiej Akademii Nauk, Dolejskova 3, 18223, Praga 8, Republika Czeska

Hof Fluorescence Group Pracownik naukowy

Planowanie i realizacja projektów badawczych; organizacja konferencji naukowych;

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Po uzyskaniu stopnia doktora, w swojej działalności naukowo-badawczej skupiam się na badaniach związanych z tymi aspektami biofizyki błon lipidowych, które są ważne dla rozwoju nowych technologii wytwarzania formułacji liposomowych. Mimo tego, że liposomy są znane od trzech dekad, oraz że każde rozwiązanie wprowadzone na rynek było sukcesem zarówno komercyjnym jak i merytorycznym, to technologia ta nie jest powszechnie stosowana. Taki stan rzeczy jest spowodowany brakiem zrozumienia mechanizmów molekularnych wiodących do formowania liposomów. Brakuje przede wszystkim wiedzy dotyczącej roli środowiska wodnego w procesie samoagregacji lipidów. Projektowanie i wytwarzanie liposomowych postaci leków wymaga połączenia wyników badań podstawowych w zakresie nauk fizykochemicznych i biochemicznych, których planowanie oparte jest o dogłębne zrozumienie procesów fizjologicznych oraz patofizjologicznych. Dodatkowo badania te muszą być prowadzone zgodnie z zasadami i metodami współczesnej farmacji. Wyniki tych badań wykorzystywane są do projektowania i konstruowania autorskich urządzeń, gdyż na rynku nie ma gotowych rozwiązań technicznych i technologicznych do wytwarzania wyrobów nanomedycznych. Tym samym technologie liposomowe będąc częścią nano-medycyny są ważnym elementem współczesnej inżynierii biomedycznej. Prowadzenie prac naukowo-badawczych oraz wdrożeniowych w zakresie technologii kierowanych nośników leków w ogólności a technologii liposomowych w szczególności, jest przedsięwzięciem interdyscyplinarnym. To spowodowało, że w swojej pracy naukowo-badawczej, od lat współpracuję ze środowiskiem inżynierów konstruktorów, elektroników, fizyków oraz lekarzy i farmaceutów. Nowatorski charakter prowadzonych badań spowodował, iż ta współpraca odbywa się z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami akademickimi oraz z partnerami przemysłowymi. Połączenie badań podstawowych i aplikacyjnych w zakresie rozwoju technologii liposomowych było możliwe dzięki wynikom prac stanowiących osiągnięcie naukowe. Realizacja badań podstawowych oraz prac rozwojowych była możliwa dzięki pozyskanym przeze mnie środkom finansowym pochodzącym ze źródeł publicznych i prywatnych. Interdyscyplinarny charakter badań wymagał koordynacji dużych zespołów badawczych, z czego w czterech projektach byłam liderem konsorcjum. Wynikiem tych prac są publikacje naukowe w czasopiśmie międzynarodowych, uzyskane patenty i zgłoszenia patentowe, głównie o zasięgu międzynarodowym. Moja aktywność naukowa oraz wdrożeniowa w formie liposomowych produktów i autorskiego miejsca wytwarzania form liposomowych znalazła uznanie środowiska wyrażone nagrodami i wyróżnieniami.

Prace stanowiące osiągnięcie naukowe to cykl publikacyjny dotyczący opracowania metod oceny transportu wody przez dwuwarstwy lipidowe. Zdobytą wiedzę wykorzystano do opracowania nowych procesów wytwarzania, w wyniku których wprowadzono na rynek unikalne produkty. Publikacje z okresu od 2010 roku do 2017 roku zostały przedstawione chronologicznie od najstarszych do najnowszych, a wyniki i opracowania w nich zawarte nie dotyczą w żadnym stopniu prac prowadzonych w trakcie doktoratu. Opis w punktach [P1-P7] przedstawia mój wkład w powstanie publikacji, natomiast wkład współautorów został zamieszczony w oświadczeniach o współautorstwie.

a. Tytuł osiągnięcia naukowego:

“Mechanizm transportu wody przez dwuwarstwę lipidową i jego wykorzystanie w technologii wytwarzania nanożeli liposomowych dla potrzeb zastosowań biomedycznych.”

b. Publikacje lub inne prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

P1. Przybyło M, Borowik T, Langner M

Fluorescence Techniques for Determination of the Membrane Potentials in High Throughput Screening.

Journal of Fluorescence. 2010, vol. 20 nr. 6 s. 1139-1157

Jest to pierwsza praca opublikowana po doktoracie jako praca przeglądowa, pisana na zaproszenie, dotycząca wysokoprzepustowych metod pomiaru potencjałów występujących na błonie. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu zagadnień dotyczących metodologii pomiarów potencjału dipolowego z zastosowaniem sond fluorescencyjnych, pod kątem przygotowania badań określających transport wody przez dwuwarstwę lipidową. Pomiar bezpośredni możliwy jest jedynie z zastosowaniem modelu monowarstwy lipidowej i opiera się on na wykorzystaniu elektrod jonizowanych. Wyniki dla tego modelu błon nie zgadzają się ilościowo z wynikami otrzymanymi z badań dwuwarstwy. Badania w modelu dwuwarstwy wykorzystują zmiany w sygnałach NMR oraz EPR, jak również bazują na technikach fluorescencyjnych. W pracy omówiono szczegółowo dotychczasowe wyniki oceny potencjału dipolowego dla wybranych sond fluorescencyjnych, które wykorzystałam następnie w badaniach pasywnego transportu wody przez błony pęcherzyków liposomowych omówionych w [P4]. Mój wkład oceniam na 33%.

5 letni IF	IF z roku publikacji	liczba pkt. MNiSW w roku publikacji	Liczba cytowań
1.701	1.966	32	14

P2. Cyprych K, Procek J, Langner M, Przybyło M

Improved method to evaluate the ability of compounds to destabilize the cellular plasma membrane. Chemistry and Physics of Lipids. 2011, vol.164 nr. 4 s. 276-282

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń dotyczących określenia warunków pomiaru transportu wody indukowanego osmotycznie w celu opracowania metody oceny transportu z uwzględnieniem wszystkich możliwych warunków granicznych. Dotychczasowa metoda dostępna w literaturze, w tym wcześniejsze prace w laboratorium, zakładały pomiar w jednym arbitralnym punkcie różnicy ciśnienia osmotycznego. Wprowadzenie „skanu osmotycznego” umożliwiło określenie optymalnej różnicy ciśnienia osmotycznego, który gwarantuje całkowitą hemolizę oraz minimalizuje rozrzuty wyników. W pracy przeprowadziłam doświadczenia, wykazujące zakres stosowalności metody w zależności od gatunku, od którego pochodzi krew (człowiek, królik). W pracy planowałam i wykonywałam doświadczenia, w celu określenia zakresu stosowalności nowo opracowanej metody oraz brałam udział w opracowaniu wyników i pisaniu tekstu manuskryptu. Mój wkład oceniam na 50%.

5 letni IF	IF z roku publikacji	liczba pkt. MNiSW w roku publikacji	Liczba cytowań
3.367	2.571	27	1

P3.Lis M, Wizert A, **Przybyło M**, Langner M, Świątek J, Jungwirth P, Cwiklik L
The effect of lipid oxidation on the water permeability of phospholipids bilayers.
Physical Chemistry Chemical Physics. 2011, vol. 13 nr. 39 s.17555-17563

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu oraz wykonaniu doświadczeń w części eksperymentalnej pracy. Dotyczyła ona doświadczalnej oceny transportu wody przez dwuwarstwę lipidową, komplementarną do badań przeprowadzonych metodami dynamiki molekularnej. Badania prowadzone były na liposomach typu LUV (Large Unilamellar Vesicles) zbudowanych z DOPC z dodatkiem lipidu utlenionego – POVPC. Celem pracy była ocena integralności dwuwarstwy lipidowej w obecności lipidów utlenionych. W tym celu opracowana została metoda oceny transportu wody w oparciu o technikę zatrzymanego przepływu, która pozwoliłaby ocenić wyniki otrzymane techniką dynamiki molekularnej. Metoda ta następnie była rozwijana w [P5], [P4] oraz wykorzystana w [P7] i [P6]. W pracy zaplanowałam i przeprowadziłam część doświadczalną oceny transportu wody. Przeprowadziłam analizę danych oraz pisałam część manuskryptu dotyczącą fragmentu eksperymentalnego. Mój wkład oceniam na 30%.

5 letni IF	IF z roku publikacji	liczba pkt. MNiSW w roku publikacji	Liczba cytowań
4.449	3.573	40	49

P4.Przybyło M, Procek J, Hof M, Langner M
The alteration of lipid bilayer dynamics by phloretin and 6-ketocholestanol.
Chemistry and Physics of Lipids. 2014, vol. 178 s. 38-44

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu doświadczeń (zaplanowanie i prowadzenie eksperymentu w technice SR, analiza danych, pisanie manuskryptu) w zakresie metody „relaksacji rozpuszczalnika” (ang. *solvent relaxation technique*), które miały na celu określenie wpływu potencjału dipolowego na transport wody w poprzek błony. W doświadczeniach wykorzystano wyniki z opracowania przygotowanego w [P1] w zakresie fluorescencyjnych metod oceny zmian w potencjale dipolowym oraz metodologię zaproponowaną w [P3]. Zmiany w poziomie uwodnienia błony oraz ruchliwości cząsteczek lipidu pod wpływem zmian w potencjale dipolowym, miały bezpośredni wpływ na pasywny, transport wody indukowany ciśnieniem osmotycznym. Mój wkład oceniam na 50%.

5 letni IF	IF z roku publikacji	liczba pkt. MNiSW w roku publikacji	Liczba cytowań
2.650	2.422	25	4

P5.Przybyło M, Drabik D, Lukawski M, Langner M
Effect of Monovalent Anions on Water Transmembrane Transport.
Journal of Physical Chemistry B. 2014, vol.118 nr 39 s. 11470-11479

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu doświadczeń w części dotyczącej wpływu jonów z serii Hofmeistera (kosmo vs cheo tropy) na pasywny transport wody, w oparciu o opracowaną metodologię [P3] (bez analizy krzywych). Ponieważ transport wody nie jest mierzony wprost i wymaga interpretacji zmian obserwowanego rozpraszania światła, w pracy dołączono dane potwierdzające, iż zmiana sygnału pochodząca od światła rozproszonego koreluje ze zmianą fluorescencji 6-

karboksyfluoresceiny, w trakcie samogaszenia, które zachodzi w wyniku wypływu wody z wnętrza liposomów. Oddziaływanie jonów z dwuwarstwą lipidową zostało dodatkowo potwierdzone wynikami z pomiarów ITC. W badaniach oprócz planowania i prowadzenia doświadczeń brałam udział w pisaniu manuskryptu. Mój wkład oceniam na 35%.

5 letni IF	IF z roku publikacji	liczba pkt. MNiSW w roku publikacji	Liczba cytowań
3.187	3.302	30	5

P6. Przybyło M, Borowik T, Langner M

Liposome-based methodologies to assess pharmacokinetic parameters of drugs.

W: Liposomes in analytical methodologies ed. by Katie A. Edwards. (Cornell University) Singapore: Pan Stanford Publishing, cop. 2016. s. 345-383

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu opracowania dotyczącego zastosowania liposomów jako modelu błony do badania przechodzenia związków przez błonę, szczególnie pod kątem zastosowań biomedycznych. Podrozdział 9.3.1 (wstęp) oraz 9.5 „Membrane Permeability Determination”. Doświadczenie zdobyte w trakcie badań prowadzonych przeze mnie w zakresie [P1-P5] pozwoliły mi określić warunki graniczne stosowania metod do oceny transportu molekuł w poprzek błon lipidowych w oparciu o liposomowy model dwuwarstwy lipidowej. Na bazie prac własnych oraz analizy literaturowej przygotowano dyskusję dotyczącą założeń metodologii wykorzystującej zamknięcie sondy/znacznika wewnątrz liposomów (**jak w [P4]**). Mój wkład oceniam na 30%.

5 letni IF	IF z roku publikacji	liczba pkt. MNiSW w roku publikacji	Liczba cytowań
0	0	5	3

Współczynnik Field-Weighted Citation Impact w bazie Scopus, wynosi 0,83 dla monografii naukowej.

P7. Przybyło M, Drabik D, Szostak K, Borowik T, Kloesgen B, Dobrucki J, Sikorski A, Langner M

Changes in lipid membrane mechanics induced by di- and tri-phenyltins.

Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 2017, vol. 1859 nr 8 s. 1301-1309

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu eksperymentów oraz wykonaniu doświadczeń w zakresie: badań techniką mikromanipulacji, w celu określenia właściwości mechanicznych błon lipidowych (przez wyznaczenie modułu Younga) na modelu mikroliposomów wytwarzanych techniką elektroformacji oraz jego zmiany w obecności dwu oraz trój fenylku cyny (IV)¹, opracowaniu metody oraz wykonaniu pierwszych doświadczeń do ceny współczynnika podziału fenylków do błony, na podstawie biosensora fluorescencyjnego (wyniki do publikacji zostały powtórzone w celu weryfikacji poprawności oznaczeń). W pracy przeprowadzałam również doświadczenia na hodowlach komórkowych makrofagów, które wykazały niespecyficzne, toksyczne działanie obu związków, związane ze zmianą przepuszczalności błon komórkowych (doświadczenia również były powtórzone w celu weryfikacji poprawności obserwowanych zmian). Obserwowane zmiany w obrazowaniu techniką mikroskopii konfokalnej wykazały zaburzenia w integralności wewnątrzkomórkowych struktur błonowych, co w efekcie skutkowało apoptozą komórki, co określono w oparciu o obserwowane zmiany morfologiczne (pęcherzyki apoptotyczne). Zmiany w mechanice błon zbadane przeze mnie techniką mikromanipulacji (moduł na rozciąganie) oraz zmiany w module na zginanie (ang. *bending rigidity coefficient*), określone przez współautorów, wykazały wyraźną korelację ze zmianami w przepuszczalności wody w obecności badanych związków, korzystając z opracowanej

¹ https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/triphenyltin_chloride#section=Chemical-and-Physical-Properties

przeze mnie metodologii, opisanej w pracach **P2-P5**. Jest to przykład zastosowania już metody stanowiącej osiągnięcie naukowe. Mój wkład oceniam na 40%.

5 letni IF	IF z roku publikacji	liczba pkt. MNiSW w roku publikacji	Liczba cytowań
3.640	3.438	35	1

Wskaźniki parametryczne publikacji

Pozycja:	5 letni IF	IF z roku publikacji	liczba pkt. MNiSW w roku publikacji	Liczba cytowań
Suma:	18,994	17,272	194	74

Wszystkie publikacje znajdują się w bazach Web of Science oraz Scopus. Współczynnik Field-Weighted Citation Impact w bazie Scopus, wynosi 0,83 dla monografii naukowej (poz. 2).

c. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Tytuł osiągnięcia naukowego:

“Mechanizm transportu wody przez dwuwarstwę lipidową i jego wykorzystanie w technologii wytwarzania nanozeli liposomowych dla potrzeb zastosowań biomedycznych.”

Spis treści:

1.	Wprowadzenie	12
2.	Wstęp	14
2.1	Transport wody w poprzek błon lipidowych w układach biologicznych	14
2.2	Zjawisko samoagregacji lipidów i jego rola w formowaniu liposomów	16
2.3	Znaczenie transportu wody przez błony w technologii kierowanych nośników leków	17
3.	Ogólny cel prac badawczych	18
3.1	Opracowanie metody oznaczania transportu wody w błonach biologicznych	18
3.2	Opracowanie metody oznaczania dyfuzyjnego transportu wody w poprzek dwuwarstwy lipidowej	20
3.3	Wpływ struktury dwuwarstwy lipidowej na transport wody w poprzek błony	26
3.4	Wpływ składu fazy wodnej na transport wody przez błony	27
3.5	Korelacja parametrów mechaniki dwuwarstwy lipidowej z transportem wody	29
4.	Podsumowanie i wnioski	30
4.1	Mechanizm transportu wody i jego znaczenie w technologii wytwarzania kierowanych nośników leków	30
4.2	Główne osiągnięcia cyklu naukowo-badawczego	31
5.	Obecne projekty i zagadnienia badawcze	32

1. Wprowadzenie

Opracowanie będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego pt. **“Mechanizm transportu wody przez dwuwarstwę lipidową i jego wykorzystanie w technologii wytwarzania nanożeli liposomowych dla potrzeb zastosowań biomedycznych”** składa się z treści zawartych w 7 publikacjach, dokumentujących rozwój metodologii badawczej, która pozwoliła na wykazanie relacji pomiędzy lokalnymi zmianami w dwuwarstwie lipidowej a biernym transportem wody. W fizjologii sam transport wody przez błony biologiczne jest zjawiskiem znanym i przejawia się w formie osmozy. Transport wody przez błony biologiczne jak i błony modelowe jest przedmiotem badań od lat. Transport ten opisywany jest parametrami makroskopowymi, takimi jak współczynnik przepuszczania. Parametry te oparte są na uproszczonym modelu błony, który zakłada, że transport odbywa się na drodze dyfuzji przez jednorodną błonę. Główna trudność z tym modelem polega na tym, że cząsteczki wody, z racji wysokiej polarności, nie powinny wnikać do jednorodnej hydrofobowej błony. **Powoduje to, że do dziś nie istnieje spójny i powszechnie uznany opis mechanizmu molekularnego tego procesu, który jest udokumentowany wynikami doświadczalnymi.** Skuteczny, z punktu widzenia aplikacji, model doświadczalny transportu wody generowanego różnicą ciśnień osmotycznych wymaga zdefiniowania i sparametryzowania błony półprzepuszczalnej, która jest warunkiem koniecznym, aby zjawisko osmozy wystąpiło. Trudności z doбором właściwego modelu eksperymentalnego oraz ze sposobem detekcji strumienia wody, powodują, że nieliczne doniesienia literaturowe dotyczące transportu wody przez błony powstałe w wyniku samoorganizacji nie dostarczają danych pozwalających na jednoznaczne sformułowanie modelu dla strumienia wody. Zrozumienie mechanizmu molekularnego dla biernego transportu wody w poprzek błon lipidowych stanowi kluczowe zagadnienie wielu ważnych obszarów inżynierii biomedycznej. Transport wody indukowany różnicą ciśnień osmotycznych zmienia stan błony półprzepuszczalnej i jest ważnym czynnikiem mechano-sensorycznym na poziomie komórkowym i tkankowym. Transport wody przez agregaty lipidowe jest także krytycznym elementem procesu wytwarzania kierowanych nośników leków czy, opartych o liposomy, biosensorów. Ciśnienia osmotyczne oraz sposoby ich kontrolowania są kluczowe dla zrozumienia funkcjonowania organów opartych o błony półprzepuszczalne rozdzielające przedziały wodne. Przykładami tego są; transport masy i objętości w ciałku szklistym oka czy równowaga ciśnień onkotycznych w tkankach. Brak takiej równowagi w tym drugim przypadku wynika ze zmian przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych dla albuminy. Poznanie i ilościowe opisanie procesów entropowych, których przykładem jest osmoza wymaga podejścia interdyscyplinarnego łączącego

biofizykę i fizykochemię agregatów makromolekularnych, w szczególności powstałych w wyniku samoorganizacji błon biologicznych, biologię molekularną i fizjologię. Dodatkowo, badania tych procesów wymagają opracowania i zastosowania wyrafinowanych modeli koncepcyjnych i doświadczalnych. Modele doświadczalne powinny odzwierciedlać nie tylko rzeczywistość biologiczną, ale także umożliwiać opracowanie modeli teoretycznych weryfikowanych mierzalnymi parametrami. Modele błon biologicznych obejmują zarówno skalę makro jak i nano. Każdy z tych modeli wymaga innego warsztatu doświadczalnego oraz innego podejścia metodologicznego. Modele makro wymagają zastosowania mikromanipulacji w połączeniu z technikami obrazowania wspomaganymi zaawansowaną analizą obrazu, np. do określenia parametrów mechanicznych błony. Do analizowania modeli błony w skali nano wykorzystywane są techniki spektroskopowe, dynamiczne i kalorymetryczne. Niezależnie od zastosowanego modelu doświadczalnego czy zastosowanej techniki pomiary ilościowe wymagają zdefiniowania parametrów, które najczęściej są szacowane na podstawie określonych założeń co znacząco utrudnia interpretację uzyskanych wyników. Wszystkie dostępne techniki pomiarowe, z wyjątkiem dynamicznego rozpraszania światła i mikroskopii elektronowej, stosowane są wyłącznie w badaniach podstawowych. Brak jakichkolwiek technik przydatnych do charakteryzacji i optymalizacji procesu wytwarzania nanostruktur lipidowych wymusił konieczność zaprojektowania i zbudowania dedykowanych urządzeń i opracowania nowych technik pomiarowych. W badaniach wykorzystywano własne, prototypowe konstrukcje, dzięki którym możliwe było wykonanie serii pomiarów techniką fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej z analizą szumu $1/f$ (ang. *flicker noise*) z wykorzystaniem modelu mikroliposomów. Obserwacje transportu wody wykonano w oparciu o nową metodę wykorzystującą technikę zatrzymanego przepływu z detekcją światła rozproszonego w tandemie z techniką dynamicznego rozpraszania światła. Zaproponowana metoda, w przeciwieństwie do innych metod określających w sposób pośredni transport wody przez błony, nie wymaga zastosowania przetwornika sygnału jakim jest sonda fluorescencyjna co znacząco uprościło analizę zbieranych danych. Opracowaną metodę wykorzystano do określenia zmian w procesach przepływu wody w zależności od zmian w strukturze błony (obecność jonów w interfazie czy utlenionych lipidów). Na podstawie otrzymanych danych zaproponowano molekularny model transportu wody, który zakłada powstawanie w błonie defektów strukturalnych, zmieniających chwilową lokalną integralność/ciągłość błony. Pokazano także, iż prawdopodobieństwo utworzenia lokalnego defektu, który umożliwia dyfuzję wody jest zależne od wielkości termicznych fluktuacji oraz od właściwości mechanicznych błony.

Przeprowadzone badania stanowią próbę wyjaśnienia zjawiska transportu wody w oparciu o wyniki doświadczalne i mają bezpośrednie zastosowanie w autorskiej technologii wytwarzania żeli

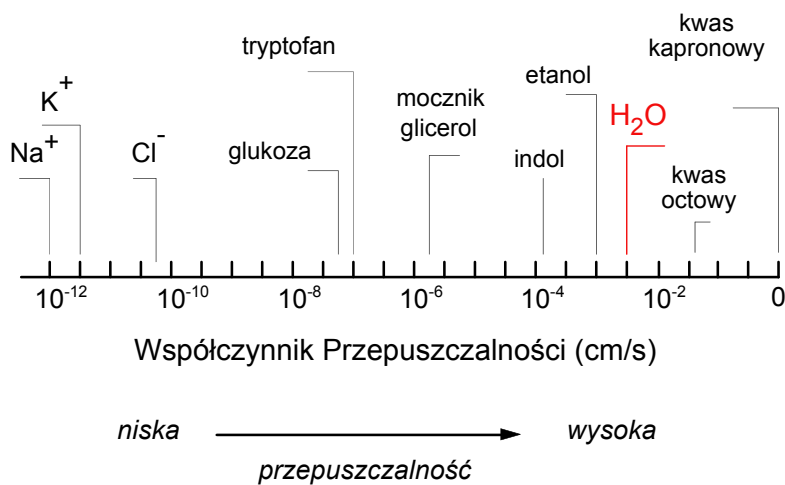
liposomowych, opublikowanej w międzynarodowym patencie WO2018172504-A1 – pkt. II – C – 3. 3. Przybyło, M., M. Langner, and T. Borowik. "Unilamellar Liposome with One Lipid Bilayer Enclosing Hydrophilic Space Useful in Liquid Composition for E.G. Medicament and Cosmetic Product, Comprises Hydrophobic Compound Forming Lipid Bilayer, and Propylene Glycol or Glycerin." Lipid Systems sp z o.o.

2. Wstęp

2.1 Transport wody przez błony lipidowe w układach biologicznych

Jedną z fundamentalnych funkcji błony biologicznej jest jej zdolność do tworzenia dobrze zdefiniowanych homeostatycznie, wewnątrzkomórkowych, przedziałów wodnych [1][2]. Zdolność utrzymania lokalnej homeostazy jest niezbędna do zapewnienia wymiany materii, transformacji energii i informacji. Procesy życiowe komórki wymagają złożonych i przestrzennie zróżnicowanych strumieni masy, które są niezbędne do podtrzymania potencjałów błonowych oraz różnicy potencjałów chemicznych w oddzielonych błoną przestrzeniach wodnych komórki. Wzajemnie sprzężone strumienie mas pomiędzy przedziałami napędzane są pompami, np. Na^+ , K^+ -ATPaza, które w procesie tzw. transportu aktywnego pierwotnego podtrzymują różnice potencjałów elektrochemicznych kosztem energii metabolicznej (ATP). Uważa się, iż w przypadku transportu biernego na drodze dyfuzji prostej krytycznym parametrem, określającym zdolność molekuly do pasywnego przechodzenia przez dwuwarstwę lipidową, jest jej polarność czyli zdolność do wnikania w błonę. W ogólności im cząsteczka jest bardziej polarna i tym samym lepiej rozpuszczalna w wodzie tym gorzej przechodzi przez błonę [3]. Zależność tą przedstawia Rysunek 1, gdzie zestawiono współczynniki przepuszczalności [cm/s] wybranych związków w funkcji ich polarności. Wyraźnym wyjątkiem w tym zestawieniu jest woda, dla której zmierzona

wartość współczynnika przepuszczalności wynosi 10^{-2} i jest on zbliżony do cząsteczek etanolu, molekuly znacznie mniej polarnej[4].



Rys. 1 Współczynniki przepuszczalności [cm/s] dla wybranych molekuł obrazujący ich zdolność do pasywnej dyfuzji w poprzek dwuwarstwy lipidowej.

Doświadczenia oparte o pomiary zjawiska hemolizy oraz na modelowych błonach biologicznych czy modelowych dwuwarstwach lipidowych, wykazują iż woda posiada zdolność dyfuzji przez błonę pomimo jej wysokiej polarności [P2], [5],[6, 7]. Sam mechanizm transportu nadal nie posiada jednoznacznego opisu. W efekcie, w literaturze funkcjonuje kilka hipotez tłumaczących przechodzenie wody przez dwuwarstwę lipidową. Pierwszą z nich to model dyfuzji przez rozpuszczalność, gdzie pojedyncze cząsteczki woda wnikają w błonę lipidową (ang. *solubility diffusion model*) [8], [3], [9]. Drugi model to model dyfuzji przez pory przejściowe (ang. *transient pore model*). W modelu tym podstawowym trybem transportu wody nie jest dyfuzja pojedynczych cząsteczek wody, ale zakłada się powstawanie przejściowych porów składających się z klastrów cząsteczek wody, przemieszczających się kooperatywnie przez dwuwarstwę lipidową. W modelu tym powstanie porów wynika z fluktuacji gęstości błony, zarówno w obszarze interfazy jak i w obszarze hydrofilowym błony. Natura tych dynamicznych nieciągłości błony może być hydrofobowa, łącząc objętości hydrofobowe dwuwarstwy bądź hydrofilowa, stabilizowana grupami polarnymi lipidów, odwróconych do wnętrza dwuwarstwy. Zakład się, że pory hydrofobowe posiadają znacznie krótszy czas życia, rzędu psek i są sub-nanometrowych rozmiarów. Pory hydrofilowe wymagają znacznie większej reorganizacji błony niż tylko lokalnych fluktuacji gęstości, są one bardziej stabilne i mają większe średnice, rzędu 0,7-0,9 nm [10], [P5-P3, P1]. Modele te uwzględniają rolę takich parametrów jak hydrofobowość substancji przechodzącej przez błonę, ich rozmiar cząsteczkowy oraz kształt. Wpływ na taki transport błony ma skład i gęstość upakowania cząsteczek

lipidów w błonie. Model transportu wody przez błonę wybierany jest raczej arbitralnie tak aby był zgodny uzyskiwanymi danymi eksperymentalnymi [11]. Mimo, że woda łatwo przenika przez błonę lipidową, w układach biologicznych dodatkowo występują białka wspomagające jej transport – akwaporyny [12]. Ich odkrycie zostało nagrodzone nagrodą Nobla w roku 2003[13]. Obecność tych białek transbłonowych tłumaczona jest wymogami kinetycznymi. Ilość akwaporyn skorelowana jest z wielkością wymaganych fizjologicznie strumieni wody np. w nerkach. Białkom tym przypisuje się także inne funkcje o czym świadczą doniesienia o ich roli, m in. w regulacji procesów neurologicznych jak pamięć czy plastyczność synaptyczna[14], w rozwoju i progresji nowotworów [15, 16], w stanach zapalnych [17, 18], czy funkcjonowania układu immunologicznego [19]. Transport wody, nie jest więc jedyną funkcją akwaporyn, szczególnie w świetle łatwości z jaką woda przenika przez dwuwarstwę lipidową, w której białka te są zanurzone, [P4-P5],[P7] [3, 20-22].

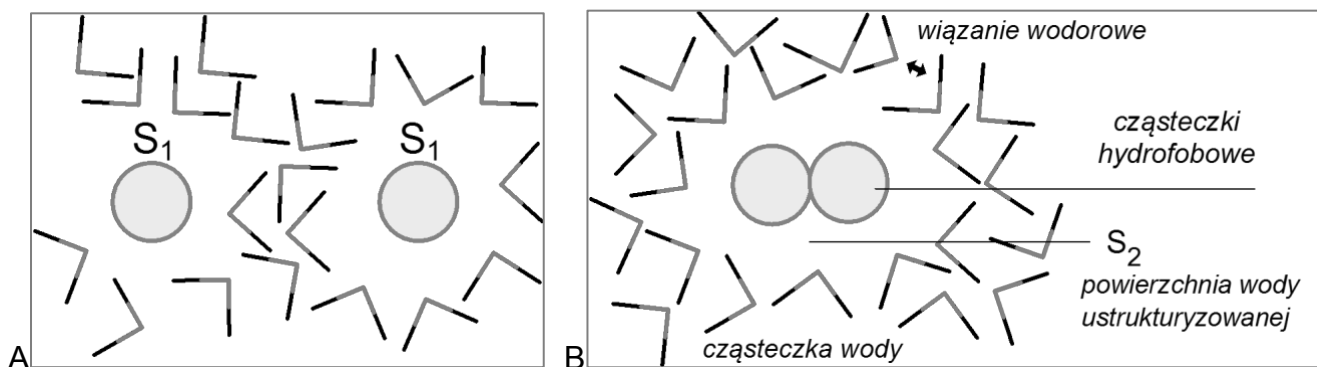
2.2 Zjawisko samoagregacji lipidów i jego rola w formowaniu liposomów

Podstawą tworzenia się liposomów jest **efekt hydrofobowy**, zjawisko będące wynikiem maksymalizacji entropii układu składającego się z licznych cząsteczek wody i cząsteczek lipidów[23, 24]. Woda posiada maksymalną entropię w stanie, w którym jej cząsteczki mają możliwość utworzenia jak największej liczby wiązań wodorowych z innymi cząsteczkami wody. Jeśli wprowadzimy do niej inne substancje nastąpi reorganizacja jej cząsteczek tak, aby zminimalizować energię swobodną, przy jednoczesnej maksymalizacji entropii (równanie 1)

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (1)$$

Jeśli wprowadzona cząsteczka (jak np. jon) będzie silnie oddziaływać z cząsteczkami wody, zmiana entalpii będzie większa niż zmiana entropii, stąd cząsteczki pozostaną rozpuszczone w wodzie.

W sytuacji, gdy cząsteczka dodana do wody ma niską polarność i brak zdolności tworzenia wiązań wodorowych, konieczna zmiana entropii układu będzie znacznie większa. Brak możliwości oddziaływania z cząsteczkami wody, skutkuje minimalizacją powierzchni „uporządkowania wody” $S_2 < 2S_1$, czego konsekwencją jest agregacja cząsteczek, jak to schematycznie przedstawiono na rys.2



Rys. 2 Proces agregacji cząsteczek hydrofobowych w wodzie powoduje iż całkowita powierzchnia “uporządkowania wody” jest zmniejszona $2S_1 > S_2$ ($\Delta S > 0$).

2.3 Znaczenie transportu wody przez błony w technologii kierowanych nośników leków

Z powodu biokompatybilności, znaczna część kierowanych nośników leków oparta jest na sferycznych strukturach lipidowych – liposomach. Jednym z decydujących czynników o przydatności liposomów do zastosowań farmakologicznych jest możliwość ich wytwarzania w warunkach przemysłowych w sposób powtarzalny z punktu widzenia jednorodności rozmiarów i składu, gdy wytwarzane są z mieszanin lipidów. Obecne na rynku preparaty liposomowe charakteryzują się powtarzalnym rozmiarem z dobrze zdefiniowanym rozrzutem nie przekraczającym 8 % (np. Doxil/Caelyx liposomowa forma doksorubicyny posiada liposomy, których średnia średnica hydrodynamiczna wynosi $85 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ pomiędzy seriami). Jednym ze sposobów wytwarzania liposomów o zadanym rozmiarze jest ich kalibracja na filtrach poliwęglanowych z porami o odpowiednim rozmiarze. Jednakże, same pory nie gwarantują uzyskania pożądanego rozmiarów. Konieczne jest także opracowanie precyzyjnych reżimów procesowych. Ekstruzja liposomów z dużych agregatów wielowarstwowych wymaga zapewnienia stałego przepływu objętości, który nie będzie powodował akumulacji lipidów na powierzchni filtra. Proces ekstruzji zależy więc od dwóch czynników; mechanicznych cech agregatów lipidowych, które zależą w głównej mierze od składu lipidów i temperatury wytwarzania oraz od wielkości strumienia wody przez błony lipidowe, który gwarantuje uformowanie się jednowarstwowych liposomów w trakcie przechodzenia przez pory na filtrze. Geometria procesu (duże rozmiary wielowarstwowych agregatów w stosunku do średnicy por w filtrze) powoduje, że powstanie liposomu wymaga kinetycznej harmonizacji strumienia wody przez błonę z prędkością procesu ekstruzji. Określenie transportu przez błonę lipidową jest więc krytycznym parametrem procesowym, decydującym o wydajności procesu ekstruzji jak i jakości (homogenności) uzyskiwanych liposomów. Niewystarczający strumień wody przez błonę lipidową może spowodować heterogenność liposomów z punktu widzenia składu szczególnie w sytuacji, gdy liposomy formowane są

z mieszanin lipidów różniących się podatnością na odkształcenie (np. fosfatydylocholino i cholesterolu). Znany jest fakt, że źle dobrane parametry procesowe skutkują liposomami, których skład odbiega od zamierzonego a ich populacja jest heterogenna z punktu widzenia proporcji lipidów w pojedynczych liposomach [25].

3. Ogólny cel prac badawczych

Celem badań było opracowanie efektywnej metodologii oceny transportu wody przez dwuwarstwą lipidową jako narzędzia do rozwoju technologii wytwarzania nanożeli liposomowych do zastosowań biomedycznych, w szczególności jako kierowanych nośników substancji aktywnych biologicznie. Prace te przyczyniły się do opracowania autorskiej technologii pozwalającej zamykać z dużą wydajnością substancje hydrofilowe, w skali przemysłowej, takie jak hydrofilowe substancje niskocząsteczkowe, polimery, białka czy kwasy nukleinowe. Dzięki łatwej możliwości skalowania od gramatury laboratoryjnej (<1g) do tysięcy kilogramów, dane z badań przepuszczalności w skali laboratoryjnej pozwoliły rozwinąć testowane rozwiązania do skali produkcyjnej. Możliwość kontroli transportu wody przez błony jest jednym z kluczowych czynników, których zrozumienie pozwala rozwijać opracowaną technologię i oraz kontrolować sposób formowania pęcherzyków lipidowych w zależności od właściwości środowiska wodnego.

3.1 Opracowanie metody oznaczania transportu wody w błonach biologicznych

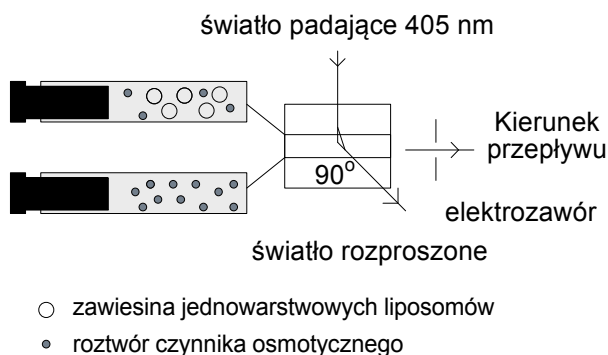
[P2] Biologiczna aktywność molekuł w dużej mierze zależy od dwóch czynników; jednym z nich jest specyficzność działania na poziomie molekularnym, drugą zdolność do przechodzenia przez barierę jaką jest błona biologiczna. Specyficzność to parametr, który jest względnie łatwo mierzalny za pomocą metod biochemicznych bądź metodami dynamiki molekularnej. Przepuszczalność błony to parametr, który nadal nie jest łatwy do przewidzenia bądź określenia na podstawie dostępnych metod. Nadal brakuje jasnych kryteriów oceny substancji pod kątem ich zdolności do przechodzenia przez błony biologiczne. Jednym z pierwszych modeli błony biologicznej wykorzystywanym do oceny oddziaływania molekuł z błonami biologicznymi była błona plazmatyczna erytrocytów. Erytrocyty nie posiadają wewnętrznych organelli, dzięki czemu nie mają możliwości kompensacji powierzchni błony. Ich ekspozycja na działanie ciśnienia osmotycznego, poprzez pomiar zmiany transmitancji światła w funkcji czasu to jedno z podstawowych metod określenia integralności błony lipidowej. Metoda ta bazuje na założeniu, iż ciśnienia osmotyczne powstałe w wyniku rozcieńczenia fazy wodnej, w której zawieszono są erytrocyty, powodują wpływ wody do ich wnętrza a w konsekwencji ich pęknięcie co określa się mianem hemolizy. Proces ten monitorowany

jest jako zmiana transmitancji światła, którego główną składową jest światło rozproszone. W technice tej pomiar wykonywany jest poprzez gwałtowne zmieszanie równych objętości zawiesiny erytrocytów w płynie fizjologicznym z roztworem posiadającym znacząco niższe ciśnienie osmotyczne. Powszechnie stosowana metoda jest metodą statyczną, gdzie poziom hemolizy określa się dla szeregu próbek o różnej wielkości różnicy ciśnień osmotycznych po zadnym czasie. Zaproponowana przeze mnie metoda jest metodą dynamiczną, gdzie mierzona jest zależność zmiany rozpraszania światła w funkcji czasu dla zawiesiny erytrocytów wystawionych na działanie zadanej różnicy ciśnień osmotycznych. W tym celu, pozyskano erytrocyty ze świeżej krwi zdrowych osobników (RCKiK we Wrocławiu) lub zwierząt (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) i rozcieńczono w soli fizjologicznej do stałej wielkości hematokrytu równego 1%. Kinetykę osmotycznie indukowanej lizy tak przygotowanych erytrocytów mierzono techniką zatrzymanego przepływu, w której rejestrowano transmisję światła w funkcji czasu. Urządzenie pomiarowe (BioLogic, Grenoble France) zostało wyposażone w lampę ksenonowo-rtęciową, monochromator o szczelinach 0,5 nm oraz kwarcową kuwetę przepływową o długości drogi optycznej 1 cm. Zawiesinę erytrocytów (300 mOsm) zmieszano z wodą destylowaną w różnych proporcjach, indukując w ten sposób różne gradienty ciśnienia osmotycznych. Przepuszczalność światła rejestrowano przy 610 nm w odniesieniu do czystej wody, dla której ustalono 100% wartości przechodzenia światła (transmitancję). Krzywe zbierano przez 60 s z szybkością próbkowania 10 ms. Ponieważ spadek natężenia światła przechodzącego przez próbkę może być wynikiem zarówno absorpcji, jak i rozpraszania, zarejestrowano dodatkową kinetykę przy niższych długościach fali odpowiadających absorpcji hemoglobiny. Stwierdzono, że niezależnie od długości fali światła obliczone parametry kinetyczne hemolizy były statystycznie nie do odróżnienia. Absorpcja próbki wynika wyłącznie z obecności hemoglobiny, której stężenie pozostaje stałe podczas eksperymentu. Dlatego ilość zaabsorbowanego światła jest również stała i nie przyczynia się do procesów zależnych od czasu.

Podsumowanie: Na podstawie obserwacji zmian w zachowaniu kinetyk w funkcji ciśnienia osmotycznego, zaproponowałam wprowadzenie techniki „skanu osmotycznego” co umożliwiło określenie optymalnej różnicy ciśnienia osmotycznego, które gwarantuje całkowitą hemolizę oraz minimalizuje rozrzuty wyników. W pracy przeprowadziłam doświadczenia, wykazujące skuteczność i zakres stosowalności metody w zależności od gatunku, od którego pochodzi krew (człowiek, królik). Jest to jedna z podstawowych metod oceny toksyczności w trakcie badań nad nowymi nanoosiłnikami. Prawidłowość metodologii pomiarowej, walidowanej w kontekście zarówno dodatniego jak i ujemnego wyniku decyduje o możliwości dalszego wykorzystania testowanego nośnika liposomowego.

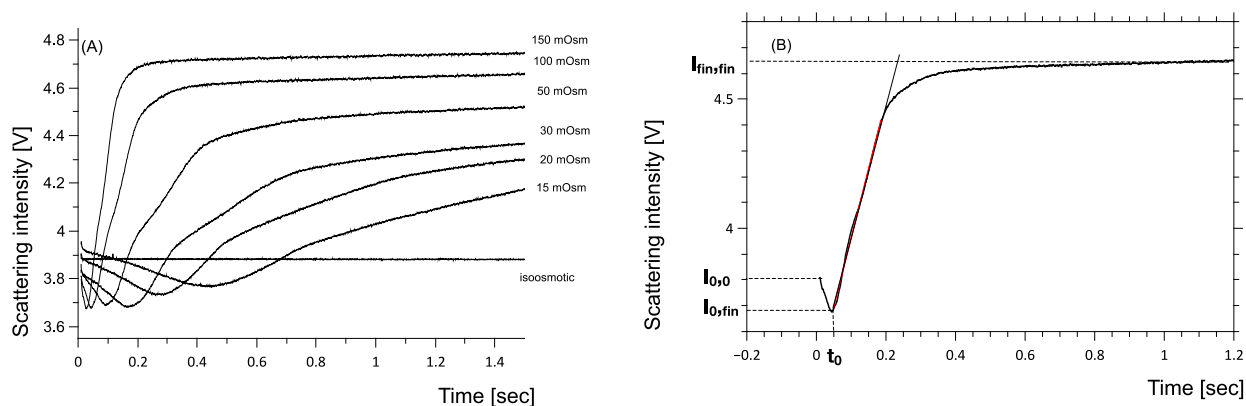
3.2 Opracowanie metody oznaczania dyfuzyjnego transportu wody przez dwuwarstwy lipidowe

Dotychczas opracowano szereg technik pozwalających mierzyć dynamikę uwodnienia błony lipidowej, w tym jej dyfuzji, co przedstawiono w jednej z ostatnich prac przeglądowych [26]. Należą do nich: techniki rozpraszania neutronów [27, 28], spektroskopia dielektryczna [29], spektroskopia teraherców (THz) [30], spektroskopia fluorescencji w skali femtosekundowej (fs) [31] jak w skali psek-nanosek] jak podają nowsze prace [31-34] oraz techniki NMR [35], w szczególności, ^2H NMR [36], spektroskopia jądrowa Overhausera (NOESY), ^{17}O oraz ^2H - dyspersja relaksacyjna magnetycznego rezonansu jądrowego (NMRD), i ^1H NMRD z i bez użycia znaczników spinowych [37]. Każda z nich wymaga wysokospecjalistycznego sprzętu, unikalnych kompetencji od operatora oraz skomplikowanych modeli pozwalających właściwie zinterpretować dane eksperymentalne. Dlatego rzadko są one stosowane w warunkach przemysłowych, gdy są opracowywane i sprawdzane liposomy jako element nowych narzędzi farmakologicznych w postaci kierowanych nośników leków. Ostatnio pojawiły się w literaturze wyniki oparte o symulacje komputerowe. Dla potwierdzenia wyników wymagają one jednak wsparcia w postaci danych doświadczalnych z racji trudności z opracowaniem samego modelu wody [38-40]. W celu oceny transportu wody w poprzek dwuwarstwy lipidowej w sposób racjonalny z punktu widzenia nakładów czasowych i finansowych zastosowałam alternatywne rozwiązanie korzystając z częściowo opisaną w [P2], techniki zatrzymanego przepływu. Opiera się ona na monitorowaniu zmian światła padającego na próbkę w funkcji czasu, z możliwością akwizycji od milisekund do dziesiątek godzin. Mierzone zmiany intensywności światła w czasie mogą wynikać ze zmian w absorpcji, transmisji, rozpraszaniu, polaryzacji czy fluorescencji. Dzięki temu zaproponowane rozwiązanie jest mocno uniwersalne. Do oceny transportu wody zastosowano podejście, w którym monitorowane jest zmiana światła rozproszonego tak jak przedstawia to schemat przedstawiony na rysunku 3.



Rys. 3 Schemat układu pomiarowego do oznaczeń transportu wody przez dwuwarstwę lipidową.

Liposomy, o określonym składzie lipidów, zawieszane w wybranym roztworze soli bądź cukru, mieszane są w czasie krótszym niż milisekundy z roztworem tego samego czynnika osmotycznego o wyższym stężeniu. W wyniku różnic w ciśnieniu osmotycznym pomiędzy wnętrzem a zewnątrz liposomów, następuje wyciek wody z liposomów. Skutkiem tego zjawiska jest zmiana w natężeniu światła rozproszonego na powierzchni liposomów. Rozpraszanie światła w funkcji czasu rejestruje się pod kątem 90° w stosunku do wiązki padającej. Układ wyposażony jest w lampę ksenonowo-rtęciową, monochromator o szczelinie 0,5 nm i kwarcową kuetę przepływową o długości drogi optycznej 1,5 mm. Długość fali wiązki padającej ustawiono na 405 nm. Sama technika pomiaru, po raz pierwszy zaprezentowana w [P3] i wykorzystana do badania zjawisk transportu wody przedstawionych w [P4], [P5], [P7], znana była wcześniej. Nowością w zaproponowanym przez mnie podejściu, było uwzględnienie w analizie, zjawiska zachodzącego przed wzrostem intensywności światła rozproszonego, oznaczonego na rysunku 4 jako t_0 . Wcześniejsze prace korzystające z tej techniki pominęły obecność obserwowanej zmiany w rozpraszaniu, która jak wykazano w trakcie



Rys. 4 A Kinytyki zmiany rozpraszania światła na liposomach (egg-PC) w obecności różnicy ciśnienia osmotycznego zbierane po zmieszaniu roztworu liposomów z roztworem soli KCl. Linia prosta pokazuje zmianę w rozpraszaniu w warunkach izoosmotycznych. B. Ilustracja procesu kurczenia się liposomów z wyróżnionymi obszarami zmian opisanymi szczegółowo w tekście.

prowadzonych prac, bardzo silnie zależy od warunków doświadczalnych, takich jak wielkość różnicy ciśnienia osmotycznego oraz składu dwuwarstwy lipidowej, jak opisano w [P3], potencjału dipolowego [P4] czy typu jonu w fazie wodnej [P5]. Pozwoliło to uzyskać znacznie więcej informacji zarówno o samym transporcie wody jak i podatności mechanicznej badanej dwuwarstwy.

Układ doświadczalny zastosowany w prezentowanych badaniach składa się z jednowarstwowych pęcherzyków lipidowych utworzonych w roztworze, którego ciśnienie osmotyczne ma wartość bliską zera. Następnie pęcherzyki poddaje się działaniu roztworu o wysokim ciśnieniu osmotycznym i

monitoruje wynikową kinetykę kurczenia się pęcherzyków. Ponieważ ciśnienie osmotyczne wewnętrznej fazy wodnej pęcherzyka jest pomijalne, różnica ciśnień osmotycznych w poprzek membrany pozostaje stała przez cały czas trwania eksperymentu. Zakładając, że pole powierzchni pęcherzyków się nie zmienia, strumień wody można opisać następującą zależnością:

$$\frac{dV}{V_w A dt} = \frac{P \Delta \pi}{RT} \quad (2)$$

gdzie A to powierzchnia pęcherzyków, P współczynnik przepuszczalności dla wody, V_w molowa objętość wody, $\Delta \pi$ różnica ciśnień osmotycznych w poprzek błony.

W takim przypadku, zgodnie z równaniem 2, strumień wody powinien pozostać stały w czasie, co oznacza, że zależność objętości pęcherzyka w czasie powinna się zmieniać liniowo z nachyleniem proporcjonalnym do iloczynu stężenia soli poza pęcherzykiem i współczynnika przepuszczalności błony. Przykłady doświadczalnych krzywych kinetyk zebranych dla liposomów uformowanych z fosfatydylocholinoi jajecznej, w funkcji różnicy ciśnienia osmotycznego przedstawiono na Rys. 5A. Wszystkie krzywe mają złożony charakter niezgodny z przewidywaniami uproszczonego modelu reprezentowanego przez równanie 2.

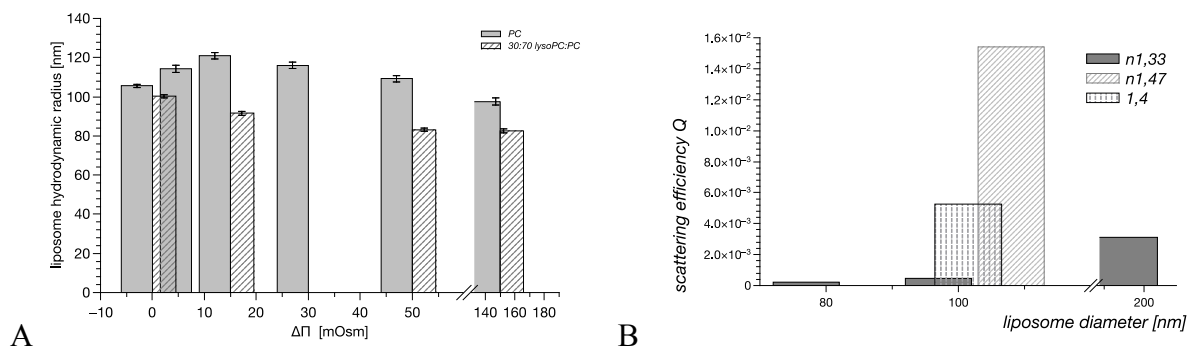
W zaproponowanym przeze mnie modelu, krzywa kinetyki transportu wody posiada wyraźne trzy obszary:

- początkowy spadek rozpraszania $I_{0,0} - I_{0,fin}$ wynikający z ustalania się równowagi na zewnątrz liposomów po zmieszaniu się dwóch roztworów
- gwałtowny wzrost rozpoczynający się od czasu t_0 $I_{0,fin} - I_{fin,fin}$ wynikający z wycieku (transportu) wody przez dwuwarstwę lipidową
- $I_{fin,fin} - I_{\infty}$ obszar ustalenia się równowagi pomiędzy ciśnieniem osmotycznym, a mechaniczną podatnością błony i fluktuacjami termicznymi

Intensywność światła rozproszonego przez zawiesinę pęcherzyków zależy od liczby liposomów obecnych na drodze optycznej, rozkładu wielkości liposomów i właściwości optycznych trzech odrębnych, choć współzależnych obszarów: zewnętrznej fazy wodnej, dwuwarstwy lipidowej i wewnętrznej fazy wodnej. Światło jest najskuteczniej rozproszone na styku między tymi regionami [41]. W trakcie eksperymentu z zatrzymanym przepływem, gdy zawiesinę liposomów miesza się z roztworem zawierającym badany związek, zewnętrzna faza wodna zmienia się, co zmienia również zewnętrzną powierzchnię dwuwarstwy lipidowej. Mieszanie zawiesiny pęcherzyków ze stężonym roztworem jest procesem, który trwa przez kilka milisekund. Dlatego początkowy spadek intensywności rozproszonego światła odpowiada zmianom strukturyzacji (reorganizacji) zewnętrznej monowarstwy błony pęcherzyka (Rys. 5B). Minimalna wartość

natężenia światła rozproszonego ($I_{0, \text{fin}}$) odpowiada sytuacji, w której interfeza każdej monowarstwy błony lipidowej jest eksponowana na różne roztwory wodne, a objętość pęcherzyka nie ulega zmianie. Następnie zawiesina liposomów przechodzi w stan równowagi, w którym różnica ciśnień osmotycznych zostaje zrównoważona przez modyfikację topologię błony. Końcowy, równowagowy poziom natężenia światła rozproszonego ($I_{\text{fin}, \text{fin}}$) odzwierciedla ostateczny, trwały stan wszystkich powierzchni lipidowych. W późniejszej analizie przyjęto, że osmotycznie indukowany strumień wody ma miejsce wkrótce po zrównoważeniu zewnętrznej fazy wodnej i trwa aż do osiągnięcia ostatecznego stanu równowagi błony lipidowej.

Aby zmierzyć wpływ różnicy ciśnień osmotycznych na strumień wody, zmodyfikowano klasyczny model biofizyczny. Rys. 5B pokazuje schematycznie typową zależność rozpraszania światła w czasie po ekspozycji pęcherzyków na różnicę ciśnienia osmotycznego [P7,P5,P4,P3]. W opracowanej metodologii stosuje się również „skan osmotyczny”, tak jak zaproponowano to w [P2], dzięki czemu otrzymuje się dodatkowe informacje o układzie. Dane literaturowe [41], rys. 6.A-B oraz wyniki opublikowane w publikacjach przedstawionych do habilitacji, pokazują, że intensywność rozproszonego światła zawiesiny pęcherzyków zależy głównie od właściwości optycznych interfezy dwuwarstwy lipidowej. Innymi słowy, zmiana współczynnika załamania błony o około 0,7 powoduje większą zmianę intensywności rozpraszania niż podwojenie średniej średnicy pęcherzyka z 80 do 200 nm (rys. 6.B). W trakcie badań, rozkład rozmiarów pęcherzyków przed i po wycieku wody był monitorowany za każdym razem za pomocą techniki Dynamicznego Rozpraszania Światła (DLS) a przykładowe dane zostały zaprezentowane na Rys.6 A. Z analizy opartej o rozpraszanie Mie, które jest obserwowane w doświadczeniu i pomiarów kontrolnych techniką DLS, wynika jednoznacznie, iż obserwowane zmiany pochodzą od zmian współczynnika załamania światła na granicy faz woda – błona, w wyniku reorganizacji błony spowodowanej wyciekiem wody i kurczeniem liposomów. Zaproponowane podejście oraz dane kontrolne w serii publikacji [P3-P7] po raz pierwszy doświadczalnie wykazały źródło wzrostu intensywności światła rozproszonego, w trakcie wycieku, mimo obserwowanego niewielkiego spadku w średnicy hydrodynamicznej liposomów.



Rys. 5 A Przykładowe wyniki pomiarów kontrolnych w technice dynamicznego rozpraszania światła mierzone w funkcji różnicy ciśnienia osmotycznego. B. Wyniki z analizy symulacji zmian w rozpraszaniu pod wpływem zmian w średnicy liposomów oraz współczynnika załamania światła na granicy faz woda-błona [P4].

Ilościowa ocena krzywych eksperymentalnych opiera się na założeniu, że woda przepływa przez spontanicznie utworzone pory lipidowe. To założenie rozszerza opis dwuwarstwy lipidowej z bariery statycznej (opisanej równaniem 2) na bliższą rzeczywistości reprezentację, gdzie błona jest traktowana jako dynamiczny agregat lipidowy. Krzywe eksperymentalne można podzielić na trzy etapy; podczas początkowego etapu (I) spadku intensywności światła rozproszonego odzwierciedlającą reorganizację zewnętrznej powierzchni dwuwarstwy lipidowej i tworzenie porów lipidowych, po dodaniu osmotycznie aktywnego związku do zewnętrznej fazy wodnej. Ten proces jest znacznie wolniejszy niż czas martwy instrumentu i zależy od warunków doświadczalnych. Założono, że w tym czasie dwuwarstwa lipidowa reorganizuje się, aby umożliwić przepływ wody. Czas trwania tej fazy jest równy „ t_0 ” i zależy od wewnętrznych właściwości dwuwarstwy, w tym od skłonności do tworzenia się porów lipidowych co wykazano w serii doświadczeń aplikacyjnych [P5, P7]. Prawdopodobieństwo otwarcia porów zależy zarówno od czynników wewnętrznych, takich jak skład i właściwości mechaniczne błony) [42, 43], oraz czynników zewnętrznych, jak obecność gradientów elektrochemicznych czy obciążenie mechaniczne [44],[45, 46]. Dopiero utworzenie się porów lipidowych umożliwia pasywny strumień wody jak to pokazuje równanie (2). Wpływ wody z pęcherzyków zmienia ich właściwości (w tym organizację interfazy dwuwarstwy), na co wskazuje rosnąca intensywność rozproszonego światła. Końcowa wartość natężenia światła rozproszonego przez zawiesinę pęcherzyków jest wypadkową właściwości interfazy każdej z monowarstw błony (wewnętrznej i zewnętrznej), po zrównoważeniu ciśnienia osmotycznego przez sprężystość mechaniczną błony i jej fluktuacje termiczne. Oznacza to, że zmiana rozpraszania światła ($I_{fin, fin} - I_{fin, 0}$) może być wykorzystana jako miara podatności błony na odkształcenie, co zostało potwierdzone za pomocą pomiarów fluorescencyjnej mikroskopii flicker-noise [P7]. Aby uwzględnić reorganizację błony po jej ekspozycji na różnice ciśnień osmotycznych, równanie 2 zmodyfikowano w następujący sposób:

$$\frac{dV}{V_w A dt} = \begin{cases} 0 & \text{for } t < t_0 \\ \frac{PD\rho}{RT} & \text{for } t \geq t_0 \end{cases} \quad (3)$$

Równanie 3 uwzględnia dwustopniową kinetykę osmotycznie indukowanego strumienia wody ocenianego na podstawie zmiany natężenia światła rozproszonego. Przedstawione dane eksperymentalne, zgodnie z przewidywaniami w literaturze, uzasadniają stwierdzenie, że skłonność do otwarcia porów lipidowych jest wewnętrzną właściwością błony, która zależy od lipidów tworzących błonę, składu faz wodnych i różnicy ciśnień osmotycznych. Krzywa kinetyczna może być parametryzowana przy użyciu dwóch wielkości dynamicznych; czasu, w którym pojawia się **lokalne minimum (t_0)** i dynamika zmiany objętości liposomów (strumień wody). Zawiesinę pęcherzyków wystawioną na działanie różnicy ciśnień osmotycznych można również analizować przy użyciu parametrów równowagowych; zmiany natężenia światła rozproszonego związanego ze zmianami interfazy w dwuwarstwie lipidowej ($I_{0, \text{fin}}$ i $I_{\text{fin}, \text{fin}}$). Rys. 5B przedstawia schematycznie te wielkości. Lokalne minimum (t_0) jest skorelowane z reorganizacją zewnętrzną interfazy, spowodowaną pojawieniem się osmotycznie aktywnego związku (soli lub sacharozy), po którym następuje reorganizacja dwuwarstwy lipidowej. Czas opóźnienia punktu odchylenia (t_0) zależy od odporności dwuwarstwy lipidowej na reorganizację i jest proporcjonalny do $(\Delta\pi)^{-1}$. [P3, P4, P5, P7].

Podsumowanie. Obserwując zachowanie zmian w rozpraszaniu światła na pęcherzykach liposomowych, w trakcie indukowanego osmotycznie wypływu wody z pęcherzyków, zaobserwowałam, iż czas potrzebny do przejścia od fazy spadku intensywności do gwałtownego wzrostu (t_0) ma powtarzalny charakter, niezależny od technicznych parametrów urządzenia pomiarowego. Czas ten zależy natomiast silnie, i w sposób liniowy, od różnicy ciśnień osmotycznych, bez względu na rodzaj użytej substancji osmotycznie czynnej (NaCl, KCl, NaBr, NaSCN, sacharoza). Wprowadzenie do metodologii techniki „skanu osmotycznego”, zaproponowanego po raz pierwszy w [P2], pozwoliło na postawienie hipotezy, iż to co widzimy w kinetyce, to transport wody poprzedzony spontanicznym utworzeniem się pory w błonie. Wykazałam również, iż obserwowany wzrost intensywności, w trakcie wycieku wody to efekt zmian we współczynniku załamania światła na granicy faz woda/błona i wynika on z reorganizacji interfazy. Wcześniej w metodzie tej zupełnie niejasne było, dlaczego w trakcie kurczenia liposomów, przy zmniejszającej się objętości rozpraszanie nie maleje a rośnie. Takie podejście pozwoliło dodatkowo obserwować względne zmiany w uporządkowaniu dwuwarstwy lipidowej jako zmiany w wartości rozpraszania jak szczegółowo opisano w [P5].

3.3 Wpływ struktury dwuwarstwy lipidowej na transport wody przez błony

Na podstawie analiz przeprowadzonych w [P1], oraz w celu potwierdzenia hipotezy o występowaniu por transbłonowych odzwierciedlonych zmianami w rozpraszaniu światła przez liposomy wystawione na działanie różnicy ciśnień osmotycznych, podjęto badania nad określeniem znaczenia właściwości dwuwarstwy lipowej dla indukowanego osmotycznie transportu wody. W publikacji tej pokazano w jaki sposób zmiana potencjału dipolowego dwuwarstwy lipidowej (wywołana obecnością molekuł zmieniających jego wartość takich jak floretyna oraz 6-ketacholestanol), zmienia podatność na wnikanie wody. Spośród znanych potencjałów elektrycznych związanych z błoną, potencjał dipolowy jest największy generując lokalnie pole elektryczne o wartości 10^9 V/m. Zasadnicza różnica pomiędzy potencjałem błonowym a potencjałami powierzchniowym i dipolowym, wynika ze źródła ich pochodzenia. Pierwszy z nich generowany jest przez zewnętrzne pole elektryczne, natomiast dwa pozostałe generowane są przez rozkład ładunków w samej dwuwarstwy lipidowej. Stąd potencjał dipolowy silnie zależy od struktury błony i pełni krytyczną rolę w procesach transportu czy w działaniu białek błonowych. W pracy [P4], bazując na opracowanej metodzie oraz pomiarach techniką „relaksacji rozpuszczalnika” (ang. *solvent relaxation technique*), wykazano, iż redukcja potencjału dipolowego zwiększa poziom uwodnienia dwuwarstwy lipidowej i w konsekwencji zwiększa przepuszczalność błony dla wody. Natomiast wzrost wartości potencjału dipolowego skutkuje spadkiem jej przepuszczalności dla wody.

Jednym z pierwszych zastosowań opracowanej metody było wykorzystanie jej do oceny tworzenia por w błonach, zawierających utlenione lipidy [P3]. Określenie i zrozumienie tego zjawiska ma znaczenie zarówno w kontekście procesów fizjologicznych zachodzących w komórkach jak również w kontekście konstruowania nośników liposomowych. W pierwszym przypadku, związany jest z faktem, iż błony komórkowe posiadają w swojej strukturze lipidy o wiązaniach podwójnych, które stosunkowo łatwo ulegają utlenianiu. To skutkuje pojawieniem się fragmentów polarnych w łańcuchu węglowodorowym, w miejscu utlenienia. W przypadku błon liposomowych nośników leków sytuacja jest bardzo podobna. Proces utleniania jest procesem, w wyniku którego nośnik liposomowy może utracić integralność dwuwarstwy lipidowej co prowadzi do uwalniania zamkniętej substancji czynnej, co jest niekorzystnym zjawiskiem w kontekście stabilności opracowywanych preparatów. W pracy [P3], określono wpływ stopnia utleniania lipidów na przepuszczalność wody przez błony fosfolipidowe zbudowane z fosfatydylocholiny (PC), wykorzystując zarówno metody doświadczalne jak i symulacje MD². W pracy

² MD ang. Molecular Dynamics, metoda symulacji komputerowych stosowana do badań dynamiki oddziaływań w oparciu numeryczne rozwiązania równań ruchu Newtona.

tej skupiono się na wpływie stopnia utlenienia lipidów na przenikanie wody i na proces powstawania porów. W badaniach doświadczalnych określono zmianę wydajności wypływu wody z pęcherzyków fosfolipidowych zawierających różne ilości utlenionych lipidów. Przeprowadzone symulacje MD modelowych, utlenionych, błon fosfolipidowych, pozwoliły ocenić prawdopodobieństwo powstania porów oraz rolę utlenionych lipidów w tym procesie. Powstawanie przejściowych porów w dwuwarstwach lipidowych może mieć daleko idące konsekwencje wszędzie tam, gdzie znaczenie ma trwałość gradientów potencjałów elektrochemicznych. Błony biologiczne odpowiedzialne są za wytworzenie i utrzymanie wewnątrzkomórkowej homeostazy jonowej, która zależy od wydajnego przepływu wody, w konsekwencji wszelkie różnice ciśnienia osmotycznego na błonach biologicznych, powstałe w wyniku różnych procesów metabolicznych, mogą być skutecznie wyeliminowane. Jednakże losowe powstawanie, charakteryzujących się niską specyficnością, porów w dwuwarstwie lipidowej jest czynnikiem obniżającym barierowe funkcje błony biologicznej oraz utrudnia utrzymanie asymetrii lipidów. W takim przypadku, białka efektywnie i specyficznie transportujące wodę, takie jak akwaporyny, zmniejszają znaczenie niespecyficznego transportu wody przez pory lipidowe. Dlatego podwyższona skłonność błony do przejściowego tworzenia porów indukowanych utlenionymi lipidami będzie nieustannie wpływała na wewnątrzkomórkową homeostazę i wymagania energetyczne dla jej utrzymania, co z pewnością zmniejszy wydajność metaboliczną komórek. Wpływ utlenionych lipidów na przepuszczalność wody przez błonę jest również krytycznym czynnikiem przy projektowaniu ukierunkowanych systemów dostarczania leków na bazie lipidów. W tym przypadku kontrola utleniania lipidów jest konieczna nie tylko dla zapewnienia stabilności składu chemicznego, ale także dla zachowania właściwości fizykochemicznych preparatu. Zamykanie związków biologicznie czynnych w nanokapsułkach lipidowych (liposomach) jest decydującym czynnikiem wpływającym na ukierunkowanie leku i rozszerzenie niepożądanych skutków ubocznych.

Podsumowanie. W pracy wykazano, iż opracowana metoda pomiaru niespecyficznego transportu wody przez błonę lipidową jest na tyle czuła i selektywna, że można przy jej pomocy ocenić znaczenie zmiany wybranych parametrów błony na jej przepuszczalność. W szczególności zmiana potencjału dipolowego i utlenienie lipidów mają znaczący wpływ na niespecyficzną przepuszczalności błony. Zaproponowana metodologia stanowiła ważne wsparcie doświadczalne właściwej interpretacji danych otrzymanych w wyniku badań MD.

3.4 Wpływ składu fazy wodnej na transport wody przez błony

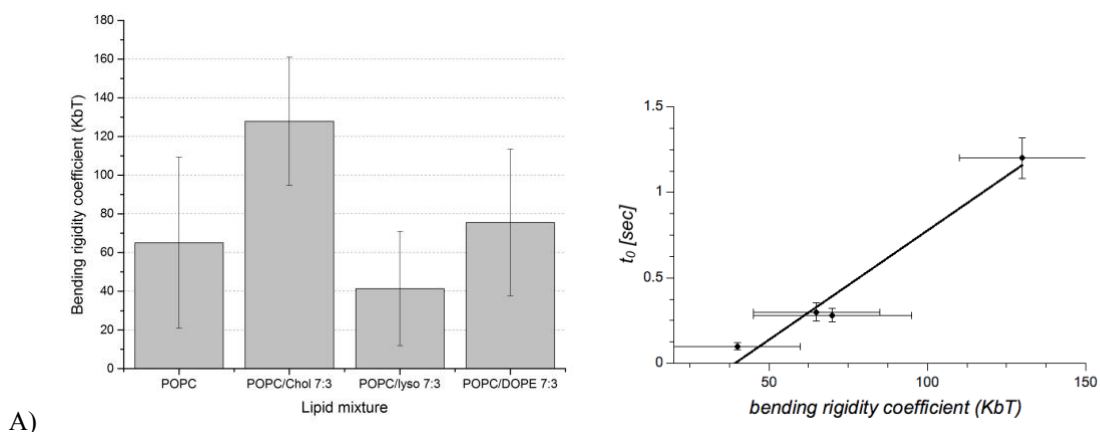
Wszystkie układy biologiczne składają się z dwóch faz: hydrofobowej i hydrofilowej, które są rozdzielone przez interfazy. Faza hydrofobowa jest obecna wewnątrz złożonych makrocząsteczek i zespołów molekularnych, takich jak błony biologiczne. Hydrofobowy rdzeń dwuwarstwy lipidowej zapobiega swobodnej wymianie polarnych i naładowanych cząsteczek między różnymi przedziałami wodnymi. Uważa się, że skład fazy wodnej wpływa nie tylko na procesy zachodzące w objętości komórki, ale także na te występujące w środowisku interfazy dwuwarstwy lipidowej. Pomimo dużej liczby prac eksperymentalnych i teoretycznych, mających na celu wyjaśnienie funkcjonalnej współzależności między fazami wodnymi i błonowymi, nadal brakuje szczegółowego zrozumienia tej zależności. Wpływ jonów hydrofilowych na strukturę i właściwości dwuwarstwy lipidowej ma szczególne znaczenie, ponieważ błony biologiczne są często narażone na ekstremalne nierównowagi potencjałów elektrochemicznych. Wykazano na przykład, że jony zakłócają uwodnienie, mobilność i organizację lipidów w dwuwarstwie lipidowej. Efekty te zależą od typu jonów i właściwości agregatów lipidowych. Badania wpływu rodzaju jonów i ich ilości na właściwości i strukturę biologicznie istotnych makrocząstek zaowocowały konstrukcją serii Hofmeistera. Seria Hofmeistera ocenia jony zgodnie z ich zdolnością do uporządkowania cząsteczek wody, co może skutkować różnymi efektami, takimi jak zmiana zdolności do wytrącania białek. W pracy [P5] określono wpływ rodzaju jonu i jego stężenia na indukowany osmotycznie strumień wody przez błony lipidowe zgodnie z wcześniej opracowaną metodologią. W celu oceny wiązania badanego jonu z błoną przeprowadzono badania przy pomocy kalorymetrii miareczkowej ITC (TAM III, TA Instruments). Gdy liposomy tworzone były w roztworach zawierających NaBr i NaCl, obserwowane zmiany natężenia światła rozproszonego były znacznie mniejsze niż te w obecności soli NaSCN. Wynik ten jest zgodny z wynikami badań kalorymetrycznych wykazujących, że jony SCN⁻ są silniej zmieniają właściwości błon niż jony Br⁻ lub Cl⁻. Gdy siła oddziaływania jon - błona jest porównywana ze współczynnikiem przepuszczalności dla wody nie obserwuje się korelacji. To wskazuje, że skład jonowy fazy wodnej nie zmienia przepuszczalności błony dla wody.

Podsumowanie: W pracy wykazano, że natężenie światła rozproszonego przez zawiesinę liposomów w trakcie indukowanego osmotycznie wypływu wody jest miarą tego zjawiska oraz jest efektem przede wszystkim zmian we współczynniku załamania światła na granicy woda-błona. Dzięki temu jest to wygodna i prosta miara zmiany uporządkowania interfazy dwuwarstwy lipidowej. Ilość światła rozproszonego przez zawiesinę liposomów zależy głównie od właściwości na granicy faz lipid-woda, na którą wpływa rodzaj i ilość jonów obecnych w fazie wodnej. Wykazano również, że skład jonowy fazy wodnej nie wpływa na wartość przepuszczalności błony lipidowej.

3.5 Korelacja parametrów mechaniki dwuwarstwy lipidowej z transportem wody

Zaproponowany model doświadczalny wraz z dedykowaną metodologią pomiarową pozwolił wygenerować dane doświadczalne wskazujące na to, że transport wody przez błonę lipidową jest możliwy dzięki spontanicznie powstającym porom. Formowanie się pory wymaga zmiany topologii agregatu lipidowego, która skorelowana jest z mikromechaniką agregatów lipidowych. Zaproponowany mechanizm transportu wody przez błony został wykorzystany na określenie mechanizmów molekularnych, które mogą być podstawą toksyczności niespecyficzej wybranych substancji amfifilowych [P7]. Badania przeprowadzone były zarówno na modelach biofizycznych jak i na komórkach. W badaniach wykorzystano techniki mikromanipulacji oraz fluorescencyjnej mikroskopii flicker-noise w celu oceny mechanicznych właściwości modelowej błony lipidowej. Uzyskane wyniki porównano z transportem wody i stwierdzono zależność pomiędzy współczynnikiem podatności na zginanie błony oraz współczynnikiem przepuszczalności błony dla wody. Błona modyfikowana była różnymi ilościami dwu- oraz trój-fenylku cyny (IV). Zmiany obserwowane w układach modelowych (liposomach) widoczne były również w eksperymentach in-vitro na hodowlach komórkowych.

Podsumowanie: Uzyskane przez mnie wyniki potwierdziły, iż zmiany w podatności błony na zginanie (mierzone jako współczynnik podatności na zginanie ang. bending rigidity coefficient – parametr będący wielokrotnością $k_B T$ określający podatność na lokalne odkształcenie błony w wyniku ruchów termalnych) skorelowany jest z podatnością do tworzenia por lipidowych. Obserwowane wyniki w [P1] są komplementarne do danych otrzymanych wcześniej, opisanych w [P3], oraz [P4], co zestawiono na rys.7A oraz 7B.



Rys. 6 A. Wykres podsumowuje obserwowaną w pracach [P7], [P4], [P3] zależność wpływu struktury błony lipidowej na jej podatność na zginanie, dla badanych składów błony lipidowej. B. Wykres przedstawiający korelację pomiędzy czasem t_0 , reprezentującym prawdopodobieństwo otwarcia pory w błonie a podatnością na lokalne odkształcenie (współczynnik modułu na zginanie), opracowany w oparciu o uzyskane wyniki na kolejnych etapach rozwoju metodologii.

4. Podsumowanie i wnioski

4.1 Mechanizm transportu wody i jego znaczenie w technologii wytwarzania kierowanych nośników leków

Wyniki moich badań pozwoliły zaproponować realistyczny model opisujący transport wody przez dwuwarstwę lipidową. Dodatkowo zaprezentowałam metodologię pomiarową i wyznaczyłam wartości parametrów mechanicznych błon liposomów. Przedstawione prace przedstawiają szczegóły techniczne i metodologiczne opracowanych metodologii wraz z możliwościami ich zastosowania w aplikacjach biomedycznych, co przedstawiono w serii publikacji aplikacyjnych [P3-P5, P7]. Na podstawie otrzymanych danych zaproponowano model opisujący molekularny mechanizm transportu polarnych cząsteczek wody przez hydrofobową barierę lipidową. Model ten zakłada pojawianie się w błonie lokalnych defektów, zmieniających jej integralność/ciągłość. W zaproponowanym modelu, transport wody zależy więc od podatności błony do formowania pory/defektu. Doświadczalnie przejawia się to niemonotonicznym charakterem kinetyki zmiany intensywności światła rozproszonego na liposomach poddanych działaniu różnicy ciśnień osmotycznych. W pracach wykazano również, iż prawdopodobieństwo utworzenia lokalnego defektu umożliwiającego dyfuzję wody jest zależne od właściwości mechanicznych błony. Po uformowaniu się pory, woda pokonuje barierę błony na drodze dyfuzji zgodnie z różnicą potencjałów elektrochemicznych a wielkość tego strumienia nie zależy od składu lipidowego dwuwarstwy. Zmiana składu lipidowego błony ma jednak znaczenie dla prawdopodobieństwa powstania pory, który szacowany jest jakościowo na podstawie wartości czasu t_0 wyznaczonego z krzywych kinetycznych rozpraszania liposomów dla serii różnicy ciśnień osmotycznych (pomiar w tzw. „skanie osmotycznym”). Sama różnica ciśnień osmotycznych także zmieniała parametr t_0 . Doświadczenie, zdobyte w trakcie prowadzenia tych prac oraz nowe spojrzenie na naturę biofizyczną liposomów pozwoliły na opracowanie autorskiej technologii wytwarzania nanożeli liposomowych. Technologia ta ma zastosowanie w farmacji do wytwarzania preparatów nowej generacji tzw. kierowanego dostarczania substancji biologicznie czynnych oraz do konstrukcji biosensorów [P6]. Rozwój nanotechnologii w kierunku możliwości rozwinięcia zastosowań biomedycznych wymaga interdyscyplinarnego podejścia, łączącego wiedzę z zakresu biofizyki i fizykochemii nanoagregatów, fizjologii, immunologii i patofizjologii z kompetencjami inżynierskimi w zakresie projektowania urządzeń i procesów. W prowadzonych pracach często rozwiązanie zagadnienia badawczego wymagało wykonania i skalibrowania autorskich urządzeń np. urządzenia do wytwarzania mikro-liposomów w warunkach termostatowanych (wielokomorowy zestaw do elektroformacji) wraz z towarzyszącą mu

elektroniką, komory do obrazowania mikro-liposomów, o konstrukcji gwarantującej minimalny ruch konwekcyjny cieczy, zautomatyzowane urządzenie do wytwarzania liposomów z pomiarem siły ekstruzji (pierwsze rozwiązanie tego typu na świecie), czy skonstruowanie urządzenia produkcyjnego do wytwarzania nanozeli liposomowych. Przeprowadzone w ramach osiągnięcia naukowego badania, poprzez sformułowania nowego spojrzenia na agregaty lipidowe, umożliwiły opracowanie uniwersalnej technologii wytwarzania liposomów na skalę przemysłową na drodze ekstruzji jak też w wyniku optymalizacji procesu samoorganizacji.

4.2 Główne osiągnięcia cyklu naukowo-badawczego

- **[P1, P2]** Na podstawie obserwacji zmian w zachowaniu kinetyk w funkcji różnicy ciśnień osmotycznych, opracowałam metodę „skanu osmotycznego” co umożliwiło określenie optymalnej różnicy ciśnień osmotycznych, które gwarantują osiągnięcie całkowitej hemolizy a przeprowadzenie wielopunktowego pomiaru pozwoliło na zmniejszenie rozrzutów mierzonych parametrów. W pracy przeprowadziłam doświadczenia, pokazujące, że optymalna różnica ciśnień osmotycznych zależy od gatunku, od którego pochodzi krew (człowiek versus królik). Jest to jedna z kluczowych metod oceny toksyczności w trakcie badań nad nowymi wyrobami nano-bio-medycznymi. Prawidłowość metodologii pomiarowej, walidowanej w kontekście zarówno występowania lub braku toksyczności, wskazuje na możliwe zastosowania wyrobu nano-bio-medycznego.
- **[P3, P4]** Zaproponowałam nowy model opisujący transport wody przez błonę, który następnie wykorzystano do interpretacji krzywych kinetycznych uzyskiwanych dla zawiesiny liposomów wystawionych na działanie różnicy ciśnień osmotycznych. Nowa parametryzacja krzywych kinetycznych pozwoliła na zdefiniowanie parametrów przydatnych do rozwoju technologii liposomowych oraz wskazanie w jaki sposób parametry te mogą być modyfikowane. Opracowana nowa metodologia wskazała, że intensywność światła rozpraszane przez liposomy zależy w głównej mierze od właściwości interfezy błony co z kolei pozwoliło ocenić w jaki sposób składniki fazy wodnej oddziałują z lipidami. Dodatkowo, wprowadzenie „skanu osmotycznego” jako metody oceny właściwości liposomów, zaproponowanego po raz pierwszy w **[P2]**, pozwoliło na zaproponowanie hipotezy, iż mierzone kinetyki można spójnie zinterpretować transportem wody poprzedzonym utworzeniem się pory w błonie.
- **[P5]** Wykazałam również, iż obserwowany wzrost intensywności, w trakcie wycieku wody to efekt zmian we współczynniku załamania światła na granicy faz woda/błona i wynika on z reorganizacji interfezy w trakcie kurczenia. Wcześniej w metodzie tej zupełnie niejasne było, dlaczego w trakcie

kurczenia liposomów, przy zmniejszającej się objętości rozpraszanie nie maleje a rośnie. Takie podejście pozwoliło dodatkowo obserwować względne zmiany w uporządkowaniu dwuwarstwy lipidowej jako zmiany w wartości rozpraszania. Dzięki temu jest to wygodna i prosta miara zmiany uporządkowania interfazy dwuwarstwy lipidowej. Ilość światła rozproszonego przez zawiesinę liposomów zależy głównie od właściwości na granicy faz lipid-woda, na którą wpływa rodzaj i ilość jonów obecnych w fazie wodnej. Wykazano również skład jonowy fazy wodnej nie wpływa na wartość przepuszczalności.

- [P7] Uzyskane przez mnie wyniki potwierdziły, iż zmiany w podatności błony na zginanie (mierzone jako współczynnik podatności na zginanie ang. *bending rigidity coefficient* – parametr będący wielokrotnością $k_B T$) związane są z podatnością błony do tworzenia por lipidowych, wpływając w ten sposób na wielkość strumienia wody indukowanego różnicą ciśnień osmotycznych.
- [P6] Opracowana metodologia, razem z innymi technikami pomiaru przechodzenia przez błony lipidowe, została przedstawiona w metodycznej pracy przeglądowej w podręczniku, pod redakcją prof. Katie Edwards (Cornell University). Celem opracowania było wykazanie użyteczności liposomów w badaniach nad nowymi formami leków, zarówno dla substancji niskocząsteczkowych jak i wysokocząsteczkowych.
- Opracowane metodologie i narzędzia pomiarowe skutecznie wykorzystałam w opracowaniu autorskiej technologii wytwarzania liposomowych nośników leków, którą zgłoszono do międzynarodowej ochrony patentowej WO2018172504-A1 – pkt. II – C – 3. 3. Przybyło, M., M. Langner, and T. Borowik. "Unilamellar Liposome with One Lipid Bilayer Enclosing Hydrophilic Space Useful in Liquid Composition for E.G. Medicament and Cosmetic Product, Comprises Hydrophobic Compound Forming Lipid Bilayer, and Propylene Glycol or Glycerin." Nowa technologia wytwarzania liposomów została wdrożona do produkcji na terenie przedsiębiorstwa Lipid Systems sp. z o.o., które dzięki tej technologii jest unikalnym, w skali świata, miejscem wytwarzania liposomowych nośników leków. W sprzedaży obecnie są dwa produkty liposomowe (Ascolip[®] Liposachettes[™], VitaDLip), oparte o opracowaną technologię, natomiast w przygotowaniu do wdrożenia, kolejne cztery.

5. Obecne projekty i zagadnienia badawcze

Moja obecna działalność naukowo - badawcza, koncentruje się na rozwoju opracowanej technologii wytwarzania liposomowych nośników leków i zamykania z dużą wydajnością makromolekuł

hydrofilowych. Poniżej przedstawiam krótką charakterystykę projektów badawczych, które obecnie są przeze mnie realizowane:

- opracowanie liposomowej postaci dokсорubicyny krystalizowanej na polimerach zamkniętych wewnątrz liposomów z przeznaczeniem do uwalniania za pomocą techniki wysokozogniskowanych ultradźwięków z obrazowaniem MRI (HIFU – High Intensity Focused Ultrasound). Celem projektu jest opracowanie liposomowych nano-nośników leków, które posiadają wysoki kontrast dla fali ultradźwiękowej o wysokiej częstotliwości wynikający zarówno ze struktury błony lipidowej jak i mechanicznych właściwości wewnętrznej, zawierającej polimer, fazy wodnej. Taka konstrukcja liposomu pozwoli na kontrolowane uwalnianie zawartości nano-agregatu, lokalnie w organizmie człowieka w obszarze zogniskowanym przez ognisko wiązki generowanej techniką High Intensity Focused Ultrasound HIFU. Z sukcesem została zakończona I faza projektu 2016-2018 współfinansowanego przez Projekt „Innowacyjne nanonośniki cytostatyków w technologii Sonosome™ do lokalnego uwalniania z wykorzystaniem zogniskowanych ultradźwięków (HIFU)” całkowita wartość projektu 5 535 715,00 zł dofinansowanie 4 644 850,00 zł, okres realizacji 01.01.2016-30.06.2018r. Nr wniosku POIR.04.01.04-00-0050/15. Obecnie projekt uzyskał pozytywną opinię NCBiR w zakresie realizacji części badawczej i wszedł w fazę przygotowania do wdrożenia.
- opracowanie liposomowej formy żelaza dla poprawy biodostępności żelaza u chorych ze zdiagnozowaną anemią spowodowaną niedoborem tego składnika (m.in. pacjenci onkologiczni – kobiety z mięśniakami macicy, pacjenci przed operacjami z obniżonym poziomem hemoglobiny, pacjenci z niewydolnością nerek zakwalifikowani do leczenia nerkozastępczego).
- opracowanie nanośnika dla terapii genowych, szczególnie z wykorzystaniem siRNA. Celem projektu jest rozwój nowych strategii dostarczania kwasów nukleinowych dla terapii genowych w oparciu o innowacyjną, autorską technologię wysokowydajnego zamykania makromolekuł w liposomach. Projekt zakłada opracowanie liposomowego, nie-kationowego, nośnika zawierającego kwasy nukleinowe, który zapewniałby zarówno kontrolowany sposób zamykania polimeru, możliwość modyfikacji jego powierzchni w sposób niezależny od rodzaju i składu wewnętrznej fazy wodnej. Proponowane rozwiązanie jest ekonomicznie co powoduje, że przyszłe, oparte o tą technologię wyroby, będą atrakcyjną ofertą rynkową. Aktualnie w literaturze można znaleźć dwa typy wektorów genetycznych – wirusowe z wysoką wydajnością transfekcji oraz nie-wirusowe, głównie kationowe liposomy czy polimery, znane jako „lipo- lub poly-plexy” o niskiej efektywności. Jednak problem z powtarzalnością tworzenia struktury kompleksu lipid-DNA, wysoka cena surowców oraz bardzo

niski poziom transfekcji powodują, iż rozwiązanie to jest nieprzydatne dla zastosowań bio-nanomedycznych. W przeciwieństwie do wszystkich dostępnych rozwiązań, autorskie rozwiązanie LipoShell®, umożliwia, nieosiągalne innymi metodami, udokumentowane procenty zamknięcia polimerów z wydajnością przekraczającą 80% co znacząco poprawia efektywność wprowadzania materiału genetycznego do wnętrza komórek. W ramach projektu przewiduje się wykorzystanie posiadanej technologii do dostarczania kwasów nukleinowych do komórek skóry, pod kątem możliwości terapii genowej komórek somatycznych, w tym fibroblastów, dla zwiększenia produkcji kolagenu oraz keratynocytów, dla obniżenia ekspresji czynników indukujących odpowiedź układu immunologicznego, pod kątem możliwości zastosowania w wybranych chorobach skóry, takich jak łuszczyca.

- opracowanie liposomowych kropli do oczu z przeznaczeniem do stosowania w leczeniu Syndromu Suchego Oka (DES). Efektem działania kropli jest odbudowa uszkodzonej warstwy filmu łzowego poprzez dostarczenie optymalnego składu fosfolipidów. Projekt współfinansowany jest przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, Program Operacyjny Województwa Małopolskiego na lata 2014-2020, Oś priorytetowa: Gospodarka wiedzy, Poddziałanie 1.2.1 „Projekty badawczo rozwojowe przedsiębiorstw” na realizację projektu nr RPMP.01.02.01-12-0491/16 pt. „Prace B+R w zakresie chemii medycznej i ich zastosowanie w terapii syndromu suchego oka”. Celem projektu jest stworzenie i wdrożenie skutecznych rozwiązań będących innowacją produktową na skalę międzynarodową, którymi będą wyroby medyczne – bezetanolowe liposomowe preparaty okulistyczne do zastosowania we wspomaganiu terapii zespołu suchego oka. Skuteczność preparatów opracowanych w toku prac B+R zostanie potwierdzona w ramach pilotażowego badania klinicznego przeprowadzonego na grupie pacjentów. Finalnie opracowane preparaty dedykowane są poprawie jakości życia osób z symptomami zespołu suchego oka, tj. grupie stanowiącej wg. ostatnich szacunków ponad 30% populacji Polski. Całkowita wartość Projektu wynosi: 3 804 163,20 zł przy dofinansowaniu projektu z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego 2 333 191,20 zł

25.04.2019
M. Wójcik

Bibliografia

1. Ball, P., *Water as an active constituent in cell biology*. Chem. Rev. , 2007.
2. Daleke, D.L., *Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymetry*. J. Lipid Res., 2003. **44**: p. 233-242.
3. Finkelstein, A., *Water and Nonelectrolyte Permeability of Lipid Bilayer Membranes*. Journal of General Physiology, 1976. **68**(2): p. 127-135.
4. Lande, M.B., J.M. Donovan, and M.L. Zeidel, *The Relationship between Membrane Fluidity and Permeabilities to Water, Solutes, Ammonia, and Protons*. Journal of General Physiology, 1995. **106**(1): p. 67-84.
5. Parpart, A.K., et al., *THE OSMOTIC RESISTANCE (FRAGILITY) OF HUMAN RED CELLS*. Journal of Clinical Investigation, 1947. **26**(4): p. 636-640.
6. DalNegro, G. and P. Cristofori, *A new approach for evaluation of the in vitro haemolytic potential of a solution of a new medicine*. Comparative Haematology International, 1996. **6**(1): p. 35-41.
7. Didelon, J., et al., *Osmotic fragility of the erythrocyte membrane: characterization by modeling of the transmittance curve as a function of the NaCl concentration*. Biorheology, 2000. **37**(5-6): p. 409-416.
8. Hanai, T.H., D.A., *The permeability to water of bimolecular lipid membranes* Journal of Theoretical Biology, 1966. **11**(3): p. 370-382.
9. Zhernenkov, M., et al., *Revealing the mechanism of passive transport in lipid bilayers via phonon-mediated nanometre-scale density fluctuations (vol 7, pg 11575, 2016)*. Nature Communications, 2016. **7**.
10. Zhernenkov, M., et al., *Revealing the mechanism of passive transport in lipid bilayers via phonon-mediated nanometre-scale density fluctuations*. Nature Communications, 2016. **7**: p. 11575.
11. Mansy, S.S., *Membrane Transport in Primitive Cells*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010. **2**(8).
12. Walz, T., et al., *The three-dimensional structure of aquaporin-1*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 624-627.
13. Engel, A., T. Walz, and P. Agre, *The Aquaporin Family of Membrane Water Channels*. Current Opinion in Structural Biology, 1994. **4**(4): p. 545-553.
14. Hubbard, J.A., J.I. Szu, and D.K. Binder, *The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease*. Brain Research Bulletin, 2018. **136**: p. 118-129.
15. Tomita, Y., et al., *Role of Aquaporin 1 Signalling in Cancer Development and Progression*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(2).
16. Lan, Y.L., et al., *The potential roles of aquaporin 4 in malignant gliomas*. Oncotarget, 2017. **8**(19): p. 32345-32355.
17. Lan, Y.L., et al., *A research update on the potential roles of aquaporin 4 in neuroinflammation*. Acta Neurologica Belgica, 2016. **116**(2): p. 127-134.
18. Chang, M., *Study on the Role and Mechanism of Aquaporin 3 in Pulmonary Infection Caused by Pseudomonas Aeruginosa*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2018. **197**.
19. Holm, A., et al., *Role of Aquaporin 9 in Leukocyte Activation and Differentiation*. Molecular Biology of the Cell, 2012. **23**.
20. Rosenberg, P.A. and A. Finkelstein, *Water Permeability of Gramicidin-a-Treated Lipid Bilayer Membranes*. Journal of General Physiology, 1978. **72**(3): p. 341-350.
21. Gozen, I. and P. Dommersnes, *Pore dynamics in lipid membranes*. European Physical Journal-Special Topics, 2014. **223**(9): p. 1813-1829.

22. Kaufman, Y., A. Berman, and V. Freger, *Supported Lipid Bilayer Membranes for Water Purification by Reverse Osmosis*. Langmuir, 2010. **26**(10): p. 7388-7395.
23. Claessens, M.M.A.E., et al., *Entropic stabilization and equilibrium size of lipid vesicles*. Langmuir, 2007. **23**(11): p. 6315-6320.
24. Israelachvili, J.N. and H. Wennerstrom, *Entropic Forces between Amphiphilic Surfaces in Liquids*. Journal of Physical Chemistry, 1992. **96**(2): p. 520-531.
25. Ibarguren, M., et al., *Quantitation of cholesterol incorporation into extruded lipid bilayers*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2010. **1798**(9): p. 1735-1738.
26. Kausik, R. and S. Han, *Dynamics and state of lipid bilayer-internal water unraveled with solution state H-1 dynamic nuclear polarization*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(17): p. 7732-7746.
27. Jansson, H., et al., *Dynamics of a protein and its surrounding environment: A quasielastic neutron scattering study of myoglobin in water and glycerol mixtures*. Journal of Chemical Physics, 2009. **130**(20).
28. Russo, D., G. Hura, and T. Head-Gordon, *Hydration dynamics near a model protein surface*. Biophysical Journal, 2004. **86**(3): p. 1852-1862.
29. Kamei, T., M. Oobatake, and M. Suzuki, *Hydration of apomyoglobin in native, molten globule, and unfolded states by using microwave dielectric spectroscopy*. Biophysical Journal, 2002. **82**(1): p. 418-425.
30. Heugen, U., et al., *Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(33): p. 12301-12306.
31. Braun, S., et al., *Biomembrane Permeabilization: Statistics of Individual Leakage Events Harmonize the Interpretation of Vesicle Leakage*. Acs Nano, 2018. **12**(1): p. 813-819.
32. Koukalova, A., et al., *Distinct roles of SNARE-mimicking lipopeptides during initial steps of membrane fusion*. Nanoscale, 2018. **10**(40): p. 19064-19073.
33. Fischermeier, E., et al., *Dipolar Relaxation Dynamics at the Active Site of an ATPase Regulated by Membrane Lateral Pressure*. Angewandte Chemie-International Edition, 2017. **56**(5): p. 1269-1272.
34. Magarkar, A., et al., *Increased Binding of Calcium Ions at Positively Curved Phospholipid Membranes*. Journal of Physical Chemistry Letters, 2017. **8**(2): p. 518-523.
35. Otting, G., et al., *NMR identification of hydrophobic cavities with low water occupancies in protein structures using small gas molecules*. Nature Structural Biology, 1997. **4**(5): p. 396-404.
36. Volke, F., et al., *Dynamic Properties of Water at Phosphatidylcholine Lipid-Bilayer Surfaces as Seen by Deuterium and Pulsed-Field Gradient Proton Nmr*. Chemistry and Physics of Lipids, 1994. **70**(2): p. 121-131.
37. Grebenkov, D.S., et al., *Dimensionality of Diffusive Exploration at the Protein Interface in Solution*. Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(40): p. 13347-13356.
38. Issack, B.B. and G.H. Peslherbe, *Accuracy and precision of simulated free energies: water permeation of hydrated DPPC bilayers as a paradigm*. Molecular Simulation, 2019. **45**(4-5): p. 466-473.
39. Brocke, S.A., et al., *Prediction of Membrane Permeation of Drug Molecules by Combining an Implicit Membrane Model with Machine Learning*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2019. **59**(3): p. 1147-1162.
40. Zhao, D.H., J. Liu, and J.W. Jiang, *Porous organic cages embedded in a lipid membrane for water desalination: A molecular simulation study*. Journal of Membrane Science, 2019. **573**: p. 177-183.
41. White, G., et al., *Optical changes in unilamellar vesicles experiencing osmotic stress*. Biophys J, 1996. **71**: p. 2701-2715.

42. Jansen, M. and A. Blume, *A Comparative-Study of Diffusive and Osmotic Water Permeation across Bilayers Composed of Phospholipids with Different Head Groups and Fatty Acyl Chains*. Biophysical Journal, 1995. **68**(3): p. 997-1008.
43. Graziani, Y. and A. Livne, *Water Permeability of Bilayer Lipid-Membranes - Sterol-Lipid Interaction*. Journal of Membrane Biology, 1972. **7**(3): p. 275-&.
44. Ohno, M., et al., *Dynamic Behavior of Giant Liposomes at Desired Osmotic Pressures*. Langmuir, 2009. **25**(19): p. 11680-11685.
45. Small, E.F., N.R. Dan, and S.P. Wrenn, *Low-Frequency Ultrasound-Induced Transport across Non-Raft-Forming Ternary Lipid Bilayers*. Langmuir, 2012. **28**(40): p. 14364-14372.
46. Manna, M. and C. Mukhopadhyay, *Cause and Effect of Melittin-Induced Pore Formation: A Computational Approach*. Langmuir, 2009. **25**(20): p. 12235-12242.
47. Mojumdar, E.H. and A.P. Lyubartsev, *Molecular dynamics simulations of local anesthetic articaine in a lipid bilayer*. Biophysical Chemistry, 2010. **153**(1): p. 27-35.
48. Hogberg, C.J., A. Maliniak, and A.P. Lyubartsev, *Dynamical and structural properties of charged and uncharged lidocaine in a lipid bilayer*. Biophysical Chemistry, 2007. **125**(2-3): p. 416-424.

2. WYKAZ DOROBKU

Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki.

I. Wykaz innych (niewchodzących w skład osiągnięcia wymienionego w pkt 4) opublikowanych prac naukowych oraz wskaźniki dokonań naukowych

A. Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC)

Po doktoracie:

1. Łukawski M, Dałek P, Borowik T, Forys A, Langner M, Witkiewicz W, **Przybyło M**,
New oral liposomal Vitamin C formulation: properties and bioavailability.
Journal of Liposome Research 2019 przyjęte do druku

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu doświadczeń w zakresie opracowania liposomowej postaci witaminy C w autorskiej technologii żelu liposomowego, zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczeń klinicznych dotyczących farmakokinetyki witaminy C oraz jej biodostępności w postaci liposomowej, jak również prowadzenie analiz fizykochemicznych (reologia). Udział obejmował pozyskanie dofinansowania na prace badawcze. Mój udział procentowy szacuję na 40 %

Impact factor: 2,576 liczba pkt MNiSW: 25

2. Bar A, Targosz-Korecka M, Suraj J, Proniewski B, Jaształ A, Marczyk B, Sternak M, **Przybyło M**, Kurpínska A, Walczak M, Kostogryś R B, Szymoński M, Chłopicki S Degradation of Glycocalyx and Multiple Manifestations of Endothelial Dysfunction Coincide in the Early Phase of Endothelial Dysfunction Before Atherosclerotic Plaque Development in Apolipoprotein E/Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice.
Journal of the American Heart Association. 2019, vol. 8 nr 6 s. e011171-e011171

Mój wkład w powstanie pracy polegał na wytworzeniu i charakteryzacji liposomowej postaci gadolinium wykonanej w technologii żelu liposomowego (LipoShell®). Mój udział procentowy szacuję na 5 %.

Impact factor : 4,450 liczba pkt MNiSW: 40

3. Szostak K, Czogalla A, **Przybyło M**, Langner M
New lipid formulation of octenidine dihydrochloride.
Journal of Liposome Research. 2018, vol. 28 nr 2 s. 106-111

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu, wytworzeniu i charakteryzacji liposomowej postaci oktenidyny, przekazanej następnie do badań efektywności mikrobiologicznej. Udział obejmował również pozyskanie dofinansowania na prace badawcze. Mój udział procentowy szacuję na 40 %. Wyniki zostały zgłoszone do ochrony patentowej.

Impact factor : 2,576 liczba pkt MNiSW: 25

4. Frączkowska K, Bacia M, **Przybyło M**, Drabik D, Kaczorowska A, Rybka J, Stefanko E, Drobczynski S, Masajada J, Podbielska H, Wrobel T, Kopaczynska M
Alterations of biomechanics in cancer and normal cells induced by doxorubicin.
Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018, vol. 97 s. 1195-1203

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń i wykonaniu części eksperymentalnej dotyczącej oceny zmian w mikromechanice błon lipidowych pod wpływem doksorubicyny. Udział obejmował również pozyskanie dofinansowania na prace badawcze. Mój udział procentowy szacuję na 10 %.

Impact factor:3,457 liczba pkt MNiSW: 25

5. Drabik D, Doskocz J, **Przybyło M**
Effects of electroformation protocol parameters on quality of homogeneous GUV populations.
Chemistry and Physics of Lipids. 2018, vol. 212 s. 88-95

Mój udział obejmował zaplanowanie i opracowanie zmodyfikowanego protokołu wytwarzania mikroliposomów w technice elektroformacji, jak również zaprojektowanie i wykonanie układu do wytwarzania mikroliposomów (konstrukcja komór do elektroformacji). Udział obejmował również pozyskanie dofinansowania. Mój udział procentowy szacuję na 30 %.

Impact factor:2,766 liczba pkt MNiSW: 25

6. Doskocz J, Drabik D, Chodaczek G, **Przybyło M**, Langner M
Statistical Analysis of Bending Rigidity Coefficient Determined Using Fluorescence-Based Flicker-Noise Spectroscopy.
Journal of Membrane Biology. 2018, vol. 251 nr 4 s. 601-608

Mój udział obejmował dostarczenie warsztatu do wytwarzania liposomów (konstrukcja i wykonanie komory do elektroformacji, konstrukcja systemu do obrazowania stabilizującego pęcherzyki w trakcie pomiarów na mikroskopie konfokalnym oraz nadzór nad pracami doświadczalnymi. Mój udział procentowy szacuję na 20 %.

Impact factor:1,638 liczba pkt MNiSW: 20

7. Głogocka D, **Przybyło M**, Langner M
Molecular crowding has no effect on the dilution thermodynamics of the biologically relevant cation mixtures.
General Physiology and Biophysics. 2017, vol. 36 nr 2 s. 197-204

Mój udział obejmował prace eksperymentalne oraz analizę danych. Mój udział procentowy szacuję na 10%.
Impact factor:1,479 liczba pkt MNiSW: 15

8. **Przybyło M**, Głogocka D, Dobrucki J.W., Frączkowska K, Podbielska H, Kopaczynska M, Borowik T, Langner M
The cellular internalization of liposome encapsulated protoporphyrin IX by HeLa cells.
European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016, s. 39-46

Mój udział obejmował zaplanowanie i wykonanie doświadczeń w zakresie hodowli komórkowych, wykonania i charakteryzacji liposomów w funkcji składu błony, wykonania i charakteryzacji formułacji fotouczulacza. Mój udział procentowy szacuję na 30 %.

Impact factor:3,756 liczba pkt MNiSW: 35

9. Drabik D, **Przybyło M**, Sikorski A, Langner M,
The Effect of a Fluorophore Photo-Physics on the Lipid Vesicle Diffusion Coefficient Studied by
Fluorescence Correlation Spectroscopy.
Journal of Fluorescence. 2016, vol. 26, nr 2 s. 661-669

Mój udział obejmował opracowanie metody weryfikacji oceny współczynnika dyfuzji pod kątem kalibracji objętości ogniskowej w FCS (Fluorescencyjna Spektroskopia Korelacyjna), dla badań z liposomami. Wykonywałam doświadczenia w technice FCS oraz DLS, brałam udział w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30 %.

Impact factor: 1.461 liczba pkt MNiSW: 25

10. Drabik D, **Przybyło M**, Chodaczek G, Iglıc A, Langner M,
The modified fluorescence based vesicle fluctuation spectroscopy technique for determination of
lipid bilayer bending properties.
Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes. 2015, vol. 1858 nr 2 s. 244-252

Mój udział obejmował, pozyskanie dofinansowania, zaplanowanie doświadczeń a następnie dostarczenie warsztatu do wytwarzania liposomów (konstrukcja i wykonanie komory do elektroformacji, konstrukcja systemu do obrazowania stabilizującego pęcherzyki w trakcie pomiarów na mikroskopie konfokalnym oraz udział w pomiarach techniką mikroskopii konfokalnej oraz spinning-disc. Nie obejmował analizy danych i opracowania metodologii analizy. Mój udział procentowy szacuję na 30 %.

Impact factor: 3,498 liczba pkt MNiSW: 35

11. Głogocka D, **Przybyło M**, Langner M
Molecular Machines - a New Dimension of Biological Sciences.
Cellular & Molecular Biology Letters. 2015, vol. 20 nr 2 s. 248-264

Mój udział polegał na przygotowaniu opracowania literaturowego oraz graficznego. Uwzględnił pisanie manuskryptu. Mój procentowy szacuję na 10%.

Impact factor: 1,753 liczba pkt MNiSW: 15

12. Głogocka D, Noculak A, Pucinska J, Jopek W, Podbielska H, Langner M, **Przybyło M**
Analysis of metal surfaces coated with europium-doped titanium dioxide by laser induced
breakdown spectroscopy.
Acta of Bioengineering and Biomechanics. 2015, vol. 17 nr 3 s. 33-40

Mój udział obejmował zaplanowanie doświadczeń oraz wykonanie pomiarów techniką LIBS w celu oceny jednorodności pokrycia powierzchni metalowych powlekanych tlenkiem tytanu domieszkanowym europem. Brałam aktywny udział w pisaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 35%.

Impact factor: 0,767 liczba pkt MNiSW: 15

13. Szura D, Ozimek L, **Przybyło M**, Karłowicz-Bodalska K, Jazwinska-Tarnawska E, Wiela-Hojenska A, Han S
The Impact of Liposomes on Transdermal Permeation of Naproxen - in Vitro Studies. Acta Poloniae
Pharmaceutica. 2014, vol. 71 nr 1 s.145-151

Mój udział polegał na wykonaniu pomiarów przechodzenia przez skórę na modelu skóry z ucha świni na komorach Franz'a i opracowaniu formułacji liposomowej zawierającej naproxen. Mój udział szacuję na 15 %.

Impact factor: 0,737 liczba pkt MNiSW: 15

14. Kaczynski M, Borowik T, **Przybyło M**, Langner M
Dilution thermodynamics of the biologically relevant cation mixtures.
Thermochimica Acta. 2014, vol. 575 s. 269-275

Mój udział polegał na wykonaniu pomiarów techniką izotermicznej kalorymetrii miareczkowej – miareczkowanie roztworów wybranych par soli oraz pisaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 10%.
Impact factor: 2,184 liczba pkt MNiSW: 30

15. **Przybyło M**, Procek J, Kaczynski M, Borowik T, Hof M, Langner M
A multitime-scale approach of the lipid bilayer dynamics,
Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposome vol. 15, 2012

Mój udział polegał na zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń w zakresie wykazania zmian w dynamice dwuwarstwy lipidowej. Celem pracy było wykazanie, iż w badaniach, gdzie mierzy się zmiany w dynamice dwuwarstwy lipidowej, konieczne jest prowadzenie badań w całej skali czasowej. Na podstawie molekuł – lidokainy oraz etanolu, wykazano, iż zmiany w dynamice dwuwarstwy lipidowej mogą zachodzić np w zakresie mikrosekund (dyfuzja) podczas gdy w zakresie nanosekundowym, zmiany nie muszą być widoczne. W pracy pomiary prowadzone były technikami FCS (Fluorescencyjna Spektroskopia Korelacyjna), stopped-flow, solvent relaxation. Mój udział szacuję na 50%.

Rozdział w książce

16. Borowik T, **Przybyło M**, Pala K, Otlewski J, Langner M.
Quantitative measurement of Au and Fe in ferromagnetic nanoparticles with Laser Induced Breakdown Spectroscopy using a polymer-based gel matrix.
Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy. 2011, vol. 66 nr 9-10 s. 726-732

Mój udział polegał na zaprojektowaniu oraz wykonaniu doświadczeń techniką Spektroskopii Laserowo-Indukowanego Rozpadu do ilościowej oceny zawartości złota i żelaza w nanocząstkach ferromagnetycznych. W trakcie doświadczeń opracowano metodę ilościowego oznaczania składu w nanocząstkach bez konieczności ich rozcieńczenia. Wyniki zwalidowano techniką ICP. Mój udział szacuję na 30%.

Impact factor: 2,876 liczba pkt MNiSW: 35

Podsumowanie parametryczne:

Dorobek niewskazany jako osiągnięcie naukowe:

Pozycja	IF	MNiSW	Pozycja	IF	MNiSW	Pozycja	IF	MNiSW
1.	2,576	25	6.	1,638	20	11.	1,753	15
2.	4,450	40	7.	1,479	15	12.	0,767	15
3.	2,576	25	8.	3,756	35	13.	0,737	15
4.	3,457	25	9.	1,461	25	14.	2,184	30
5.	2,766	25	10.	3,687	35	15.	2,876	35

Sumaryczny impact factor dla publikacji innych niż wskazanych jako osiągnięcie naukowe: 36,163
Sumaryczna liczba punktów MNiSW: 380

Dorobek wskazany jako osiągnięcie naukowe:

Sumaryczny impact factor dla publikacji wskazanych jako osiągnięcie naukowe: **17,272**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **194**

Sumaryczny IF po doktoracie : 53,435

Sumaryczna liczba pkt MNiSW po doktoracie: 574

Sumaryczny IF przed i po doktoracie : $53,435+14,026 = 67,461$

Sumaryczna liczba pkt MNiSW przed i po doktoracie: $574 + 150 = 724$

Przed doktoratem:

Badania prowadzone w ramach mojej pracy doktorskiej pt. ” Wybrane Aspekty Dwuwarstwy Lipidowej” dotyczyły określenia wpływu wybranych anestetyków na dynamikę dwuwarstwy lipidowej. Miały charakter poznawczy związany z określeniem mechanizmu działania anestetyków. Podstawą do podjęcia tego zagadnienia, były dane literaturowe sugerujące możliwość modyfikacji funkcjonowania kanałów jonowych, w wyniku zmian w dynamice dwuwarstwy lipidowej. Przykładem takiej zmiany jest zmniejszenie ruchliwości lipidów na poziomie interfazy, co skutkuje zaburzeniami w zdolności przechodzenia kanału jonowego ze stanu otwartego do zamkniętego [47, 48]. Badania przeprowadzono dla czterech anestetyków oraz w trzech skalach czasowych. Wykazano zależność pomiędzy potencjałem anestetycznym badanych molekuł a ich zdolnością do redukcji ruchliwości lipidów w błonie na poziomie interfazy w skali nanosekundowej (technika „solvent relaxation”). Mimo silnego wpływu na ruchliwość lipidów skali nanosekundowej, nie zaobserwowano zmian w dyfuzji lipidów. Współczynnik dyfuzji mierzony techniką FCS (Fluorescencyjnej Spektroskopii Korelacyjnej), nie zmienił się w sposób statystycznie istotny w obecności anestetyków. Otrzymane wyniki były zbieżne z wynikami z dynamiki molekularnej [47, 48]. W pracy przedstawiono także wyniki dotyczące wpływu badanych anestetyków na funkcjonalność kanału gramicydyny, transportującego jony H^+ oraz K^+ . W badaniach wykazano, iż obecność anestetyków zaburza transport protonów, co zmierzono w układzie modelowym w oparciu o opracowany liposomowy biosensor fluorescencyjny. **Gotowa praca została złożona w Instytucie Fizyki w czerwcu 2009 roku. Od momentu złożenia pracy, mając na uwadze chęć pozostania w nauce, rozpoczęłam nowy zakres badań związany już bezpośrednio z zagadnieniami dotyczącymi rozwoju liposomowych kierowanych nośników leków.**

17. Grzybek M, Kubiak J, Lach A, **Przybyło M**, Sikorski AF.

A Raft-Associated Species of Phosphatidylethanolamine Interacts with Cholesterol Comparably to Sphingomyelin. A Langmuir-Blodgett Monolayer Study. Plos One. 2009;4(3).

Impact factor: 4,351 liczba pkt MNiSW: 32

18. **Przybyło M**, Borowik T, Okruszek A, Langner M

A Method to Evaluate a Propidium Iodide Association with Oligonucleotides and Oligonucleotide-Cationic Lipid Interactions.

Current drug discovery technologies 5, no. 2 (2008-Jun 2008): 162-7.

19. **Przybyło M**, Olzyska A, Han S, Ozyhar A, Langner M.

A fluorescence method for determining transport of charged compounds across lipid bilayer. Biophysical Chemistry. 2007;129(2-3):120-125.

Impact factor: 1,913 liczba pkt MNiSW: 27

20. **Przybyło M**, Borowik T, Langner M.

Application of liposome based sensors in high-throughput screening systems.

Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 2007;10(6):441-450.

Impact factor: 2,67 liczba pkt MNiSW: 27

21. **Przybyło M**, Sykora J, Humpolickova J, Benda A, Zan A, Hof M.
Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions. *Langmuir*. 2006;22(22):9096-9099.

Impact factor: 3,902 liczba pkt MNiSW: 32

22. Olzyska A, **Przybyło M**, Gabrielska J, Trela Z, Przystalski S, Langner M. Di- and tri-phenyltin chlorides transfer across a model lipid bilayer. *Applied Organometallic Chemistry*. 2005;19(10):1073-1078.

Impact factor: 1,190 liczba pkt MNiSW: 27

Pozycja:	IF	liczba pkt. MNiSW	Liczba cytowań
17.	4,351	32	17
18.	0	5	3
19.	1,913	27	5
20.	2,670	27	4
21.	3,902	32	149
22.	1,190	27	1
Suma:	14,026	150	74

B. Zrealizowane oryginalne osiągnięcia projektowe, konstrukcyjne i technologiczne

Po doktoracie

W okresie od 2011 do 2016 roku prowadziłam badania nad autorską i unikalną technologią wytwarzania żeli liposomowych oraz realizowałam prace konstrukcyjne i projektowe urządzeń stanowiących linię produkcyjną dla nowo opracowanej technologii. Prace prowadzone były w ramach założonej przeze mnie spółki typu spin-off Lipid Systems sp. z o.o. W wyniku tych prac powstała unikalna technologia wytwarzania żeli liposomowych LipoShell®, która umożliwiła wysokowydajne zamykanie substancji hydrofilowych w liposomach, w skali przemysłowej. W oparciu o to rozwiązanie uruchomiono produkcję żeli liposomowych do podaży doustnej oraz form liposomowych w postaci płynnej. Obecnie wykorzystanie terapeutyczne substancji hydrofilowych zamkniętych w liposomach jest niewielkie z uwagi na brak metody pozwalającej na uzyskanie wysokiej wydajności zamykania tych substancji. Zamykanie bierne skutkuje niewielką wydajnością zamykania substancji hydrofilowych najczęściej nieprzekraczającą kilku procent. Rozwój oraz wdrożenie autorskiej i unikalnej w skali świata technologii, zgłoszonej do ochrony patentowej w trybie PCT (pkt.C-3), to wynik połączenia wiedzy w dziedzinie biofizyki błon oraz umiejętności konstrukcyjno-projektowych, dzięki którym uruchomiono pierwszą w Polsce oraz jedną z nielicznych na świecie instalacji do produkcji liposomowych nośników leków. Cechy, które wyróżniają opracowaną technologię to: wysoka wydajność zamykania substancji hydrofilowych (powyżej 80%), w tym polimerów białek czy kwasów nukleinowych, możliwość bardzo precyzyjnej kalibracji rozkładu rozmiarów liposomów, w tym bez konieczności ekstruzji, jednorodność otrzywanej populacji liposomów (<200 nm, oraz PDI < 0.1), skalowalność procesu do ton produktu, znaczna redukcja odpadów oraz energii wytwarzania w związku z wykorzystaniem i kontrolą procesu samoorganizacji.

Zaproponowane rozwiązanie techniczne jest jedynym pozwalającym na ekonomiczne wytwarzanie liposomów metodą ekstruzji w trybie ciągłym. W kontekście technologii zamykania substancji czynnych w liposomach, nie istnieją rozwiązania technologiczne, które można by porównać do opracowanej technologii LipoShell®.

C. Udzielone patenty międzynarodowe i krajowe

Po doktoracie

1. Bilmin, K., Grieb P, Langner M, **Przybyło M**, Szopinski P. "Heparin Sodium Salt Form Used for Dermal Applications and Used as Active Ingredient of Drugs for Preventing Blood Clotting and Formation of Blood Clots in Blood Vessels, Comprises Heparin, or Its Salt, Liposomes, and/or Hydrogel." Lipolek Sp z o.o. WO2015181746-A1 PL408371-A1 PL229532-B1 nr prawa wyłącznego: 229532.

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na opracowaniu rozwiązania zamykającego heparynę w liposomach; wykonaniu doświadczeń oraz pisaniu patentu. Mój udział procentowy szacuję na 33 %

2. Borowik, T., Langner M, **Przybyło M**, Potaczek P. "Liposome Composition, Useful for Reducing Inflammation, Pain and Fever, Comprises Naproxen and Excipients, and Phospholipids (Phosphatidylcholine) in Form of Calibrated Aggregates in Conjunction with Double Alcohol (Propylene Glycol)." Przedsięb Prod Farmaceutycznej Gemi; Ppf Hasco-Lek Sa. EP2255790-A1; PL214538-B1; nr prawa wyłącznego EP2255790-B1

Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na udziale w pracach badawczych oraz technologicznych, które pozwoliły opracować stabilny i efektywny preparat zawierający naproxen. Mój udział procentowy szacuję na 20 %

3. **Przybyło, M.**, Langner M, Borowik T "Unilamellar Liposome with One Lipid Bilayer Enclosing Hydrophilic Space Useful in Liquid Composition for E.G. Medicament and Cosmetic Product, Comprises Hydrophobic Compound Forming Lipid Bilayer, and Propylene Glycol or Glycerin." Lipid Systems sp z o.o. WO2018172504-A1

Zgłoszenie patentowe. Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na opracowaniu wysokowydajnego sposobu zamykania substancji hydrofilowych w liposomach (opracowanie technologii, składu, konstrukcji urządzenia do produkcji), w procesach niskoenergetycznych. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

4. Langner, M., **Przybyło M**. "Supramolecular Aggregate in Form of Phosphatidylcholine and Octenidine Complex Useful as Disinfectant for Skin, Mucous Membranes, Wounds and Internal Organs, and Treating Skin Infections, Mucous Membranes, and Wounds." Pharmbridge Sp z o.o. EP3111958-A1

Zgłoszenie patentowe. Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na opracowaniu liposomowej formułacji oktenidyny pod kątem wytwarzania produktów dezynfekcyjnych. Mój udział procentowy szacuję na 50 %

5. Borowik, T., Langner M, **Przybyło M** "Liposome Composition, Useful for the Prevention or Treatment of Infections of Skin, comprises a Gel Containing Nisin, Lipids, Preservatives, Buffers and a Gelling Agent." Lipid Systems Sp z o.o. PL402511-A1

Zgłoszenie patentowe. Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na opracowaniu sposobu zamykania peptydu kationowego – nizyny dla efektywnego działania jako preparatu antybakteryjnego w żelach liposomowych. Mój udział procentowy szacuję na 33 %

6. Borowik T, Langner M, **Przybyło M**, International Patent Application No. PCT/EP2018/075613 "Aqueous composition comprising at least one phospholipid and further at least one terpene with acaricidal activity against demodex" 28 marca 2019 WO 2019/057899.

Zgłoszenie patentowe. Mój wkład w powstanie tego patentu polegał na opracowaniu formulacji i testach skuteczności, przeprowadzeniu analizy fizykochemicznej opracowanego rozwiązania, pisaniu treści zgłoszenia, opracowaniu wyników doświadczalnych. Mój udział procentowy szacuję na 30 %

D. Wynalazki oraz wzory użytkowe i przemysłowe, które uzyskały ochronę i zostały wystawione na międzynarodowych lub krajowych wystawach lub targach

E. Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w pkt. I A:

Po doktoracie

1. Matejek D, Drobczyński S, **Przybyło M**, Langner M, Micro- and macrorheology of newtonian fluids and complex macromolecular systems – comparison of dynamic light scattering, optical tweezers and rotary rheometry, Current Topics in Biophysics, vol. 36 (Suplement A), 2013, s. 36
2. Czernielewski L., **Przybyło M.**, Ulatowska - Jarża A., Podbielska H. Badanie fluorescencji światłoczułacza fotolonu w komórkach He-La. Acta Bio-Optica et Informatica Medica., vol. 18, nr 1, s. 55-58, 2012
3. Jopek W, Kaczyński M, Misiewicz P, **Przybyło M**, Spektroskopia Laserowo Indukowanego Rozpadu (LIBS) – Podstawy i Zastosowania, Wybrane Zgadnienia Optyki Biomedycznej dla Studentów Inżynierii Biomedycznej i Medycyny, Redaktor: Halina Podbielska (2011). Rozdział w książce w języku polskim
4. R. Eugene Zierler, redakcja Leszek Kubisz, **Magdalena Przybyło** Hemodynamika dla chirurgów naczyniowych. Chirurgia Naczyniowa i wewnątrznaczyniowa Przegląd wiedzy. Wesley S. Moore Peter F. Lawrence Gustavo S. Oderich Wydanie polskie pod redakcją prof. Grzegorza Oszkinisa, prof. Wojciecha Witkiewicza (2018) Elsevier
5. Matuszak M, Dalek L, Langner M, **Przybyło M**, A model of binding of doxorubicin with heparin and enoxaparin. International Scientific Journal Mathematical Modeling. 2018, vol. 2, nr 4, s. 167-169.
6. Duda M, Frączkowska K, **Przybyło M**, Kopaczyńska M: Charakterystyka nanostrukturalna materiału genetycznego do zastosowania w terapii genowej / Maciej Duda [i in.]. Acta Bio-Optica et Informatica Medica. 2015, vol. 21, nr 1, s. 1-8, 4 rys., bibliogr. 37 poz., Summ. ISSN: 1234-5563

F. Opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych, ekspertyz, utworów i dzieł artystycznych

G. Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania:

Sumaryczny IF przed i po doktoracie: $53,435+14,026 = 67,461$

H. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS)

314

I. Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS)

8

J. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

Po doktoracie

1. **2018-2021** Opracowanie wysokooczyszczonej formy fosfolipidów do zastosowania w produkcji liposomowych kierowanych nośników leków, wyrobów medycznych i suplementów. Umowa nr: POIR.04.01.04-00-0159/17-00. Całkowita wartość projektu: 5 010 625 zł Kwota dofinansowania: 4 259 031,25 zł Lider konsorcjum Autor wniosku i kierownik projektu
2. **2018-2020** Projekt pn „Prace B+R w zakresie chemii medycznej i ich zastosowanie w terapii syndromu suchego oka” współfinansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, Program Operacyjny Województwa Małopolskiego na lata 2014-2020, Oś priorytetowa: Gospodarka wiedzy, Poddziałanie 1.2.1 „Projekty badawczo rozwojowe przedsiębiorstw” nr RPMP.01.02.01-12-0491/16 pt. Całkowita wartość projektu: 3 804 163,20 zł kwota dofinansowania 2 333 191,20 zł – główny wykonawca, współautor technologii wykorzystywanej w projekcie
3. **2016-2018** Projekt „Innowacyjne nanonośniki cytostatyków w technologii SonosomeTM do lokalnego uwalniania z wykorzystaniem zogniskowanych ultradźwięków (HIFU)” całkowita wartość projektu 5 535 715,00 zł dofinansowanie 4 644 850,00 zł, okres realizacji 01.01.2016-30.06.2018r. Nr wniosku POIR.04.01.04-00-0050/15.Lider konsorcjum Autor wniosku i kierownik projektu
4. **2017-2019** Projekt Harmonia - NCN „Opracowanie inteligentnego farmakologicznego preparatu inhalacyjnego z możliwością kierowanej akumulacji i aktywnego uwalniania substancji czynnej zewnętrznym polem elektromagnetycznym”- kwota dofinansowania 699 100 zł Wykonawca
5. **2013-2016** – realizacja projektu badawczo-wdrożeniowego w ramach programu Demonstrator PLUS - Projekt „Innowacyjne technologie liposomowe do zastosowań w terapii nowotworowej – LIDOX” całkowita wartość projektu 8 535 000,00 zł, dofinansowanie: 6 646 000,00 zł, okres realizacji 01.04.2014-31.07.2015r. Nr umowy UOD-DEM-1-027/001 Autor wniosku i kierownik projektu
6. **2011/2013**-realizacja projektu badawczego własnego w ramach grantu nr N N302 663740 „Opracowanie metody oznaczania dystrybucji metali uwalnianych z implantów w materiałach biologicznych” / Wykonawca
7. **2010/2013** – realizacja projektu badawczego własnego „Pęseta optyczna w zastosowaniach biomedycznych” / Wykonawca

Przed doktoratem

8. **2006/2007** - realizacja projektu badawczego - grant własny przyznany przez Akademickie Centrum Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Wrocławska, 3000pln / Kierownik
9. **2006/2007** - realizacja projektu badawczego - grant własny przyznany przez Akademickie Centrum Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Wrocławska, Kierownik, 3000 pln
10. **2006/2007** (12 m-cy) Projekt TWIPSA "Transfer Wiedzy do Przedsiębiorstw Dolnośląskich - przyznawany przez Urząd Marszałkowski Dolnego Śląska, realizowany w przedsiębiorstwie CBR Novasome, 20000 pln / Kierownik Projektu

11. **2007/2010** - Realizacja projektu badawczego własnego "Opracowanie platformy liposomowej dla nanobiosensorów fluorescencyjnych" finansowanego ze środków MNiSzW, nr umowy: 1903/B/T02/2007/33 Wykonawca
12. **2007 – 2012** Realizacja projektu badawczego w ramach Inicjatywy Technologicznej I "Innowacyjne technologie liposowe dla preparatów transdermalnych" przyznanego firmie CBR Novasome w roku 2007 okres realizacji 5 lat kwota 2 866 640 pln Wykonawca
13. **2007-2009** Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka Oś priorytetowa: 4. Inwestycje w innowacyjne przedsięwzięcia. Działanie 4.2: Stymulowanie działalności B+R przedsiębiorstw oraz wsparcie w zakresie wzornictwa przemysłowego. Tytuł projektu: Przekształcenie CBR Novasome Sp. z o.o. w Centrum Badawczo-Rozwojowe kwota brutto: 5 732 973,08 PLN Wykonawca i autor wniosku

K. Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową albo artystyczną

Po doktoracie

1. **2015** –Polska Nagrody Innowacyjności,
2. **2012-2015** Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców,
3. **2012 -2013** Stypendium w konkursie Młoda Kadra 2015 plus dla młodych doktorów,
4. **2012** Pierwsza nagroda w międzynarodowym konkursie “Master of Innovation” Brno, Republika Czeska,
5. **2012** Pierwsza Nagroda w Ogólnopolskim Konkursie Przedsiębiorczości Akademickiej oraz tytuł “Akademicki Lider Biznesu” Lipid Systems, Magdalena Przybyło, Marek Langner
6. **2011 Druga Nagroda Zespołowa Prezesa Kancelarii Rady Ministrów** za wybitne osiągnięcia naukowo-techniczne za pracę pt.” Rozwój Technologii Kierowanych Nośników Leków – od badań podstawowych do wdrożenia”

Przed doktoratem

7. **2008/2009** Stypendium Naukowe na realizację projektu pt. “ Zmiany w dwuwarstwie lipidowej indukowane anestetykami, finansowane ze środków projektu “Grant – wsparcie prac badawczych poprzez stypendia naukowe dla doktorantów” Priorytet VIII Działanie 8.2 Poddziałanie 8.2.2. Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki przyznany przez Wydział Rozwoju Gospodarczego Urzędu Marszałkowskiego Województwa Dolnośląskiego,
8. **2006/2007** Stypendium TWIPSA “Transfer Wiedzy do Przedsiębiorstw Dolnośląskich” przyznawany przez Urząd Marszałkowski Dolnego Śląska.

L. Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencji tematycznych

Po doktoracie

1. **Przybyło M**, Langner M" Proton transfer through the lipid bilayer – fluorescence studies" 4th Seminar on Biophysics of Lipids, Praga 16-18 listopada 2010
2. **Przybyło M**, „Liposomal doxorubicin and MDR reversal” 1st International Seminar on Gene Sequencing in Drug Development” 01-02 lipiec 2015 Wrocław
3. **Przybyło M**, „Liposomal doxorubicin in Sonosome[®] technology for targeted delivery with high intensity focused ultrasound” 2nd International Seminar on Gene Sequencing in Drug Development” 14-15 czerwiec 2017 Wrocław
4. **Przybyło M**, „Efficient encapsulation of polymers in liposomes for controlled drug release with HIFU” 7th Wrocław – Prague Seminar on Biophysics of Lipids, 12-14 kwiecień 2018, Pierwoszków
5. **Przybyło M**, „Pharmacological and pharmacokinetic studies of oral liposomal vitamin C of enhanced bioavailability” Bone marrow transplantation – much more than haematopoietic tissue reconstitution 11th International Conference, 18-20 grudnia 2017 Wrocław

Przed doktoratem

6. **Przybyło M**, Langner M. " Człowiek - cywilizacja - przyszłość. I Konferencja Naukowa Studentów, Wrocław, 19-20 maja 2003. Wrocław : Oficyna Wydaw. PWroc., 2003. s. 353-358
7. **Przybyło M** " Micromechanics of lipid bilayers." 1st Students' Scientific Conference of Biomechanics. Bio-Mech-Young, Szklarska Poręba, 27-30 maja 2004. Wrocław: Oficyna Wydaw. PWroc., 2004. s. 13-14.

II. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta

A. Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych

Po doktoracie

1. LLP-Erasmus Program for Staff Training Mobility Academic Year 2012/ 2013, Université Montpellier 2, Pl.E.Bataillon, 34095 Montpellier, Cedex 05, France 12-23.07.2013 suma: 40h
2. LLP-Erasmus Program for Staff Training Mobility Academic Year 2010/ 2011, Institute of Physical Chemistry Czech Academy of Sciences, Dolejskova 3, Praha 8, 8-15.09.2011 suma: 40h
3. LLP-Erasmus Program for Staff Training Mobility Academic Year 2010/ 2011, Josef Stephan Institute of Physical Chemistry Lubljana, Slowenia , 29.08-5.09.2011 suma: 40h

4. LLP-Erasmus Program for Staff Training Mobility Academic Year 2009/ 2010, BioLogic SAS, 1 rue de l'Europe Claix FR-38640 France , 20-28.09.2010 suma: 40h
5. LLP-Erasmus Program for Staff Training Mobility Academic Year 2009/ 2010, Institute of Physical Chemistry Czech Academy of Sciences, Dolejskova 3, Praha 8, 1-8.08.2010 suma: 40h

B. Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Konferencje międzynarodowe po doktoracie:

1. Doskocz J, **Przybyło M**, Langner M
The effect of lipid phase on liposome stability upon exposure to the mechanical stress. W: 6th European Joint Theoretical/Experimental Meeting on Membranes, EJTEMM2018 [Dokument elektroniczny] : 12-14 December 2018, Helsinki, Finland. [Helsinki : University of Helsinki, 2018]. s. 43-43.
2. Drabik, D. **Przybyło M**, et al. (2015). "Effect of Cholesterol on the bending rigidity of DOPC lipid bilayers." European Biophysics Journal with Biophysics Letters **44**: S191-S191.
3. Lukawski, M., **Przybyło M** et al. (2015). "Liposomal doxorubicin carrier stability after endocytosis, study with FRET lifetime imaging." European Biophysics Journal with Biophysics Letters **44**: S195-S195.
4. Procek, J., **Przybyło M** et al. (2015). "Lipid gel extrusion as a new method for drug encapsulation with high efficiency." European Biophysics Journal with Biophysics Letters **44**: S197-S197.
5. Drabik, D., Langner, M., **Przybyło, M.**, Walczak, T., Algorithm development of vesicle fluctuations spectroscopy technique, Proceedings of the VI International Symposium on Trends in Continuum Physics, TRECOP"14, Poznan-Bedlewo, May 4-7, 2014. Poznań : Agencja Reklamowa COMPRINT, [2014]. s. 14-15.
6. Walczak, T., Drabik, D., Grabski, J.K., Langner, M., **Przybyło, M.**, Application of genetic algorithms for determination of the bending rigidity coefficient of lipid bilayer, Biomechanics 2014 : International Conference of the Polish Society of Biomechanics : abstracts, Łódź, September 1-3, 2014, Poland / eds. J. Awrejcewicz [i in.]. Łódź : Department of Automation, Biomechanics and Mechatronics and Faculty of Organization and Management of the Lodz University of Technology, [2014]. s. 237-238.
7. Procek J, Łukawski M, **Przybyło M**, Langner M: The quantification of doxorubicin and lipids in liposomal doxorubicin formulation / Jan Procek [i in.]. W: ESB 2015 [Dokument elektroniczny] : 27th European conference on Biomaterials, 30 August - 3 September, Kraków, Poland : final programme and book of abstracts. Kraków : Scientific Publishing House "Akapit", cop. 2015. s. 485-485, 1 tab., bibliogr. 2 poz. ISBN: 978-83-63663-63-6
8. Łukawski M, **Przybyło M**, Langner M: Determination of liposomal doxorubicin concentration in blood by fluorescence spectroscopy / Maciej Łukawski, Magdalena Przybyło, Marek Langner. W: ESB 2015 [Dokument elektroniczny] : 27th European conference on Biomaterials, 30 August - 3 September, Kraków, Poland : final programme and book of abstracts. Kraków : Scientific Publishing House "Akapit", cop. 2015. s. 492-492, 1 rys., bibliogr. 1 poz. ISBN: 978-83-63663-63-6

Lokalizacja elektroniczna: http://esb2015.org/upload/final_programme/ESB2015-Final-Programme-and-Book-of-Abstracts.pdf

9. Drabik D, **Przybyło M**, Langner M: The effect of the vesicle diameter on the bending rigidity of POPC and DOPC lipid bilayers / Dominik Drabik, Magdalena Przybyło, Marek Langner. W: ESB 2015 [Dokument elektroniczny] : 27th European conference on Biomaterials, 30 August - 3 September, Kraków, Poland : final programme and book of abstracts. Kraków : Scientific Publishing House "Akapit", cop. 2015. s. 537-537, 3 rys., bibliogr. 3 poz. ISBN: 978-83-63663-63-6
Lokalizacja elektroniczna: http://esb2015.org/upload/final_programme/ESB2015-Final-Programme-and-Book-of-Abstracts.pdf

Artykuły w materiałach konferencji krajowych po doktoracie

10. Dalek P, **Przybyło M**, Langner M
Pomiar siły ekstruzji w funkcji stężenia lipidu w procesie formowania liposomów. W: Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych : IX sympozjum, Wrocław, 22-23 czerwca 2018 : materiały konferencyjne. Wrocław : Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2018. s. 73-74
11. Głogocka D, **Przybyło M**, Langner M: Wpływ jonów metali ciężkich na przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej / Daria Głogocka, Magdalena Przybyło, Marek Langner. W: Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych : VI sympozjum, Wrocław, 19-20 czerwca 2015 : materiały konferencyjne. Wrocław : Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2015. s. 33-34, 1 rys., bibliogr. 1 poz. ISBN: 978-83-934204-8-3
12. Łukawski M, **Przybyło M**, Langner M: Optymalizacja metody ekstrakcji doksorubicyny z matryc biologicznych / Maciej Łukawski, Magdalena Przybyło, Marek Langner. W: Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych : VI sympozjum, Wrocław, 19-20 czerwca 2015 : materiały konferencyjne. Wrocław : Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2015. s. 65-66, 1 rys., 1 tab., bibliogr. 3 poz. ISBN: 978-83-934204-8-3
13. Głogocka D., Drobczyński S., **Przybyło M.**, Langner M. "Właściwości makro- i mikroreologiczne prostych i złożonych układów makromolekularnych - porównanie metod. Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych: IV sympozjum, Wrocław, 20-21 czerwca 2013: materiały konferencyjne. Wrocław: Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2013. s. 53-54.
14. Głogocka D. Gajda K. **Przybyło M.** Langner M. Wykorzystanie spektroskopii emisyjnej wzbudzonej laserem do analizy dyfuzji jonów srebra w kościach długich. Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna [Dokument elektroniczny] : XVIII krajowa konferencja naukowa, Gdańsk, 10-12 października 2013 / red. Adam Bujnowicz, Jerzy Wtorek. [Gdańsk: Wydział Elektroniki, Telekomunikacji i Informatyki Politechniki Gdańskiej, 2013]. s. 1-6.
15. Cyprych K, **Przybyło M**, "A Method Development For Determination Of The Proton Transfer Across Lipid Bilayer" VIII Konferencja Naukowa Studentów, Szklarska Poręba 23-25 sierpnia 2010; seria: Konferencje: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej str. 101-107 Punktacja PWR ZW 45/2009: 3, liczba autorów: 2

16. Procek J, **Przybyło M** "A Fluorescence Approach For Determination Of The Lidocaine Diffusion Across Lipid Membrane" VIII Konferencja Naukowa Studentów, Szklarska Poręba 23-26 08 2010 str. 172-177
17. Misiewicz P, **Przybyło M**, "The effect of the salt concentration in the confined aqueous volume on the osmotically induced water flux through the lipid bilayer.", International Conference on Medical Physics and Engineering on Physics and Engineering for Health and Wellness of Society, 21-24 Wrzesień 2011, Poznań
18. **Magda Przybyło**, Marek Langner " Proton transfer through the lipid bilayer – fluorescence studies" 4th Seminar on Biophysics of Lipids, Praga 16-18 listopada 2010.
19. Łukawski M, Zając D, Langner M, **Przybyło M**: Zastosowanie spektrofluorymetrii do obserwacji asocjacji i dysocjacji n-oleoinoilo-dopaminy z modelami białek i błon biologicznych. W: Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych : IV symposium, Wrocław, 20-21 czerwca 2013 : materiały konferencyjne Wrocław : Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2013. s. 49-50.
20. Drabik, D., **Przybyło, M.**, Langner, M., Ocena fotostabilności sond fluorescencyjnych w badaniach dyfuzji liposomów z wykorzystaniem fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej, Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych : V symposium, Wrocław, 20-21 czerwca 2014 : materiały konferencyjne. Wrocław : Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2014. s. 27-28
21. Hanus-Lorenz B, **Przybyło M**, Kazimierczuk Z, Grieb P, Langner M: Zmiany właściwości mikromechanicznych błon lipidowych indukowane inhibitorami kinazy CK2 / Beata Hanus-Lorenz [i in.]. W: Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych : V symposium, Wrocław, 20-21 czerwca 2014 : materiały konferencyjne. Wrocław : Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2014. s. 39-40
22. **Przybyło M**, Drabik D, Łukawski M, Langner M: Wpływ jednowartościowych jonów na transport wody przez błony biologiczne / Magdalena Przybyło [i in.]. W: Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych : V symposium, Wrocław, 20-21 czerwca 2014 : materiały konferencyjne. Wrocław : Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2014. s. 83-84 ISBN: 978-83-934204-5-2

Artykuły w materiałach konferencyjnych przed doktoratem

23. Thormann E, Kristiansen SP, **Przybyło M**, Kloesgen B. On the phase state and morphologies of membranes of charged lipids. *Biophysical Journal*. 2004;86(1):381A-381A.
24. Kim DH, Bezrukov S, Dathe M, **Przybyło M**, Kloesgen B. Effect of the synthetic antimicrobial peptide KLA1 on the mechanical stability of giant vesicles. *Biophysical Journal*. 2004;86(1):380A-381A.
25. Langner, M., A. Olzyska, **Przybyło M.**, J. Gabrielska, Z. Trela and S. Przystalski (2005). "Phenyltin chlorides transfer across the model lipid bilayer." *European Biophysics Journal* 34(6): 803-803.1.

26. Borowik T, **Przybyło M**, Langner M "Nuclear magnetic resonance spectroscopy in studies of biomolecules", Człowiek - cywilizacja - przyszłość. II Konferencja Naukowa Studentów. Referaty, Wrocław, 22-24 maja 2005. T. Wrocław : Oficyna Wydaw. PWroc., 2005. s. 221-226.
27. **Przybyło M**, Langner M. " Człowiek - cywilizacja - przyszłość. I Konferencja Naukowa Studentów, Wrocław, 19-20 maja 2003. Wrocław : Oficyna Wydaw. PWroc., 2003. s. 353-358
28. **Przybyło M** " Micromechanics of lipid bilayers." 1st Students' Scientific Conference of Biomechanics. Bio-Mech-Young, Szklarska Poręba, 27-30 maja 2004. Wrocław : Oficyna Wydaw. PWroc., 2004. s. 13-14.
29. Dyba P, **Przybyło M** "Wpływ melittiny na hemolizę krwi." Błony biologiczne : monografia / pod red. Janiny Gabrielskiej i Pawła Misiaka. Wrocław : Uniwersytet Przyrodniczy, 2008. s. 165-168.
30. Procek J, **Przybyło M**, Langner M " Method development for the studies of erythrocytes hemolysis." Człowiek - cywilizacja - przyszłość: VII Konferencja Naukowa Studentów, Wrocław, 18-20 maja 2009: referaty. T. 1. Wrocław: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2009. s. 187-192.
31. Cyprych K, **Przybyło M**, Langner M " Scattering stopped flow method to study kinetics of erythrocytes hemolysis." Człowiek - cywilizacja - przyszłość: VII Konferencja Naukowa Studentów, Wrocław, 18-20 maja 2009: referaty. T. 1. Wrocław: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2009. s. 181-186.
32. Kim DH, Bezrukov S, Dathe M, **Przybyło M** et al. Effect of the synthetic antimicrobial peptide KLA1 on the mechanical stability of giant vesicles Conference Information: 48th Annual Meeting of the Biophysical Society, FEB 14-18, 2004 Baltimore, MD BIOPHYSICAL JOURNAL Volume: 86 Issue: 1 Pages: 380A-381A Part: Part 2 Suppl. S Supplement: Part 2 Suppl. S Published: JAN 2004
33. Thormann E, Kristiansen SP, **Przybyło M**, et al. On the phase state and morphologies of membranes of charged lipids Conference Information: 48th Annual Meeting of the Biophysical Society, FEB 14-18, 2004 Baltimore, MD BIOPHYSICAL JOURNAL Volume: 86 Issue: 1 Pages: 381A-381A Part: Part 2 Suppl. S Supplement: Part 2 Suppl. S Published: JAN 2004
34. Cyprych K, **Przybyło M**, "A Method Development For Determination Of The Proton Transfer Across Lipid Bilayer" VIII Konferencja Naukowa Studentów, Szklarska Poręba 23-25 sierpnia 2010; seria: Konferencje: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej str. 101-107

C. Udział w komitetach organizacyjnych międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych

1. Udział w Komitecie Naukowym VIII Konferencja Naukowa Studentów, Szklarska Poręba 23-25 sierpnia 2010;
2. Udział w organizacji konferencji naukowej: 3rd Prague Seminar on Biophysics of lipids, listopad 2006, Praga -kontakt z zaproszonymi gośćmi, przygotowanie programu konferencji, organizacja logistyczna
3. Udział w organizacji konferencji naukowej: 4th Prague Seminar on Biophysics of lipids, październik 2008, Wrocław kontakt z zaproszonymi gośćmi, przygotowanie programu konferencji, organizacja logistyczna
4. Organizacja konferencji naukowej: 7th Prague Seminar on Biophysics of lipids, 12-14 kwiecień 2018, Pierwoszów Komitet Organizacyjny
5. Organizacja dwóch międzynarodowych seminariów: Gene Sequencing in Drug Development, lipiec 2015 oraz czerwiec 2017 Wrocław.

D. Otrzymane nagrody i wyróżnienia inne niż wymienione w pkt I K

1. 2018 Nagroda Rektora Politechniki Wrocławskiej,
2. 2017 Nagroda Rektora Politechniki Wrocławskiej,
3. 2016 Nagroda Rektora Politechniki Wrocławskiej,
4. 2013 Nagroda Rektora Politechniki Wrocławskiej,
5. 2012 Nagroda Rektora Politechniki Wrocławskiej,

E. Udział w konsorcjach i sieciach badawczych

Lider trzech konsorcjów naukowo-przemysłowych na rzecz realizacji projektów badawczych wymienionych w pkt. J.

1. Konsorcjum projekt 1 : Lider Lipid Systems sp. z o.o. , Wojewódzki Szpital Specjalistyczny Ośrodek Badawczo-Rozwojowy we Wrocławiu, Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN, PPHU Somar.
2. Konsorcjum projekt 2: Lider Lipid Systems sp. z o.o. , Wojewódzki Szpital Specjalistyczny Ośrodek Badawczo-Rozwojowy we Wrocławiu, Specjalistyczny Szpital ProFamilia w Rzeszowie
3. Konsorcjum projekt 3: Lider Lipid Systems sp. z o.o. , Wojewódzki Szpital Specjalistyczny Ośrodek Badawczo-Rozwojowy we Wrocławiu, Politechnika Wrocławska, Politechnika Poznańska, Wrocławski Park Technologiczny we Wrocławiu.

F. Kierowanie projektami realizowanymi we współpracy z naukowcami z innych ośrodków polskich i zagranicznych oraz we współpracy z przedsiębiorcami, innymi niż wymienione w pkt I J

G. Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism

H. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

1. Wrocławskie Towarzystwo Naukowe Oddział Medycyny, członek

I. Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki

1. Opieka naukowa nad studentką Joanną Dorskoczą; studentka kierunku Inżynieria Biomedyczna, za udział i osiągnięcia w realizacji projektów kierowanych przez habilitanta w roku 2018 była laureatką stypendium Ministra Szkolnictwa oraz w tym samym roku otrzymała Diamentowy Grant.
2. Opieka naukowa nad studentami: Piotrem Rzeszowskim oraz Katarzyną Dębińską kierunku Weterynaria na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, za udział i osiągnięcia w realizacji projektów kierowanych przez habilitanta w roku 2018 zostali laureatami Stypendium Ministra Szkolnictwa.
3. Udział w „Dniach otwartych” na Politechnice Wrocławskiej (2007-2012)
4. Organizacja staży studenckich oraz staży dla pracowników naukowych w ramach projektu „Staż sukcesem naukowca” w przedsiębiorstwach typu spin-off 2012 - 2014
5. Opiekun koła Naukowego Inżynierii Biomedycznej „Micela”
6. Od 2017 roku do dzisiaj - Koordynator autorskiego projektu praktyk zawodowych w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym Ośrodku Badawczo-Rozwojowym dla studentów I stopnia Inżynierii Biomedycznej „Asystent Pacjenta”

7. 2018 – do dzisiaj Koordynator projektu praktyk zawodowych w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym Ośrodku Badawczo-Rozwojowym dla studentów II stopnia Inżynierii Biomedycznej „Asystent Lekarza”
8. Od 2011 do dzisiaj Organizator praktyk zawodowych w firmach z branży technologii biomedycznych na Dolnym Śląsku dla studentów Inżynierii Biomedycznej.

J. Opieka naukowa nad studentami i lekarzami w toku specjalizacji

Prace magisterskie: 2012/2019

1. Joanna Doskocz Określenie profili farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych liposomowego preparatu przeciwnowotworowego.
2. Mateusz Augustyn Biedroń Wydział Elektroniki - 2017 Badanie wpływu systemu stymulacji mięśniowo-nerwowej na rozwój wybranego ośrodka ruchowego w mózgu człowieka z dysfunkcjami kończyny górnej
3. Marta Kwiecień Kinetyka oddziaływania wybranego fotouczulacza z błonami lipidowymi.
4. Joanna Włodarczyk WPPT/IB - 2013 Dyfuzja jonów w cementach chirurgicznych analizowana techniką spektroskopii laserowo indukowanego rozpadu./ Ion diffusion detected in surgical cements studied by laser induced breakdown spectroscopy.
5. Dominik Drabik WPPT/Fizyka – 2013 Dyfuzja agregatów lipidowych analizowana techniką fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej. / Diffusion of lipid aggregates studied by fluorescence correlation spectroscopy.
6. Marzena Obara WPPT/IB 2013 Model dyfuzji jonów metali w fantomie polimerowym analizowany techniką Spektroskopii Laserowo Indukowanego Rozpadu
7. Katarzyna Michalik WPPT /IB 2013 Model dyfuzji w kościach badany techniką spektroskopii laserowo indukowanego rozpadu / Diffusion of metal ions in polymer matrix studied by Laser Induced Breakdown Spectroscopy
8. Sonia Kotuła 2013 WPPT/IB Sprawdzenie jednorodności rozkładu powierzchniowego jonów metalu w kości techniką spektroskopii laserowo indukowanego rozpadu.
9. Maciej Łukawski 2012 Oznaczenie maksymalnej ilości dopaminy modyfikowanej lipidem w liposomach. The determination of the maximum encapsulation efficiency in liposomes for lipid modified dopamine
10. Magdalena Łambucka 2012 Oznaczanie poziomu zamknięcia inhibitorów kinaz w liposomowych nośnikach leków w funkcji składu agregatu. / Determination of the kinase inhibitors encapsulation in liposomal drug carriers as a function of the aggregate composition
11. Urszula Czuba 2013 Opracowanie metody analizy dystrybucji metali ciężkich w kościach techniką Laserowo Indukowanego Rozpadu / Method development of heavy metal distribution analysis in bones based on the Laser Induced Breakdown Spectroscopy Technique.

12. Zofia Kautzka 2012 Oznaczenie poziomu zamknięcia disulfiramu oraz disulfiramu sodu w liposomach - optymalizacja kompozycji / The determination of the encapsulation efficiency for disulphiram and sodium disulphiram in liposomes – composition development

Prace inżynierskie 2011/2019

1. Adrian Cytrynowski Analiza techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją rozproszeniową fosfolipidów filmu łożowego - badanie oddziaływania fosfolipidów z soczewkami kontaktowymi. 2018/2019
2. Grzegorz Czyrski Charakterystyka zależności właściwości reologicznych nanożeli lipidowych od rozkładu rozmiarów liposomów 2018/2019
3. Jarosław Kanin Ocena cytotoksyczności wybranych form kontrastów rezonansowych do obrazowania w technice rezonansu magnetycznego. 2018/2019
4. Tomasz Klimek Projekt aplikacji mobilnej do badania słuchu 2018/2019
5. Jakub Janczara Termodynamika układów zawierających inhibitory kinaz, błony lipidowe oraz albuminy 2016/2017
6. Joanna Dorskocz Charakterystyka parametrów mechanicznych i topologicznych populacji jednowarstwowych mikroliposomów 2016/2017
7. Aleksandra Kaczorowska WPPT Określenie topologicznej jednorodności dwuwarstwy lipidowej w funkcji składu błony techniką fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej
8. Ewa Porańska WPPT Optymalizacja systemu do pomiaru dyfuzji transdermalnej dla substancji hydrofobowych.
9. Marta Kamecka WPPT Oznaczenie poziomu przechodzenia przez skórę heparyny enkapsulowanej w żelu liposomowych .
10. Joanna Misiewicz WPPT Określenie wpływu wielkości próbki modelu skóry ludzkiej oraz głębokości zbiornika akceptorowego na poziom przechodzenia nizinny.
11. Adrianna Kuziak WPPT/IB Określenie wpływu składu liposomów na przechodzenie nizinny przez skórę
12. Patrycja Smaza „ Modyfikacja lidokainą transportu wody przez błony lipidowe”
13. Przemysław Kaczor „ Modyfikacja etanolem transportu wody przez błony lipidowe”

Prowadzone formy zajęć dydaktycznych

1. Zajęcia laboratoryjne: Laboratorium Podstaw Fizyki 2004/2007
2. Seminarium Bionanostruktury I 2005/2006
3. Zajęcia laboratoryjne: Laboratorium Biofizyki 2008, 2010, 2013, 2014

4. Zajęcia laboratoryjne: Technologie Informacyjne , 2010, 2013-2014
5. Laboratorium Biofizyki - Określanie kinetyki reakcji techniką zatrzymanego przepływu.(2008) opracowanie instrukcji do zajęć
6. Laboratorium Biofizyki - Oznaczanie stężeń technikami spektrofotometrycznymi.(2008) opracowanie instrukcji do zajęć
7. Zajęcia laboratoryjne prowadzone w ramach programu Erasmus Mundus - zajęcia prowadzone w języku angielskim (2008)
8. Laboratorium Biofizyki - Opracowanie metody oznaczania pKa słabych kwasów techniką konduktometryczną (2010) opracowanie instrukcji do zajęć
9. Wykład autorski do zajęć "Fizjologia" kod kursu MDP3401W (2010-obecnie)
10. Wykład autorski do zajęć "Inżynieria Tkankowa i Genetyczna" kod kursu MDP2909W (od 2011-2015)
11. Wykład autorski "Fizykochemiczne metody analityczne" - zajęcia prowadzone na filii w Jeleniej Górze kod kursu CHC1010W(2011)
12. Wykład autorski do zajęć „Kierowane Nośniki Leków” (od 2012-2017)
13. Wykład autorski do zajęć „ Nanomedycyna”(od 2012-2017)
14. Opracowanie i realizacja zajęć projektowych do przedmiotu „Bionanostruktury II” (od 2011 - obecnie)
15. Opracowanie i realizacja zajęć projektowych do przedmiotu „Nanomedycyna” (od 2012 - obecnie)
16. Opracowanie i realizacja zajęć seminaryjnych „Biosensory” (2012-2016)
17. Opracowanie i realizacja zajęć „Technologie Informacyjne” (2011-2018)
18. Opracowanie zajęć „Pakiety Obliczeniowe” (Origin , CAD/CAM) od 2019 obecnie w przygotowaniu

K. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego

1. mgr inż. Wojciech Jopek
promotor – prof. dr. hab. inż. Marek Langner, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska;
drugi promotor – prof. dr hab. inż. Romuald Będziński, Wydział Mechaniczny, Uniwersytet Zielonogórski;
promotor pomocniczy – dr inż. Magdalena Przybyło, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska,
data wszczęcia przewodu doktorskiego- 14.09.2015
temat rozprawy doktorskiej: Optymalizacja biomanipulatora typu ręka człowieka do zastosowania w celach protetycznych dla pacjentów z różnym stopniem amputacji.
2. mgr inż. Kamila Szostak
Promotor: prof. dr. hab. inż. Marek Langner, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska;
promotor pomocniczy – dr inż. Magdalena Przybyło, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska;
data wszczęcia przewodu doktorskiego - 02.06.2016
temat rozprawy doktorskiej: Komórkowy model farmakokinetyczny przeznaczony do testowania kierowanych nośników leków;

3. mgr inż. Maciej Łukawski
Promotor: prof. dr. hab. inż. Marek Langner, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska;
promotor pomocniczy: dr inż. Magdalena Przybyło, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska;
data wszczęcia przewodu doktorskiego, 02.06.2016
temat rozprawy doktorskiej: Nośnik leków z możliwością kontrolowanego uwalniania indukowanego falą mechaniczną;

L. Staże w zagranicznych i krajowych naukowych ośrodkach naukowych lub akademickich

1. 31/5/2007 - 16/9/2009 Centrum Badawczo-Rozwojowe Novasome, ul. Olsztyńska 5, Wrocław Koordynator Projektów Koordynacja projektów badawczych; opracowywania formulacji farmaceutycznych; projektowanie linii technologicznych do produkcji wyrobów farmaceutycznych; przeprowadzanie testów In-vitro; analizy fizyczne, fizyko-chemiczne; opracowywanie projektów badawczych
2. 1/10/2006 - 31/12/2006 Instytut Chemii Fizycznej Czeskiej Akademii Nauk, ul. Dolejskova 3, 18223, Praga 8, Republika Czeska - Hof Fluorescence Group Pracownik Naukowy
3. Polska, Polska Akademia Nauk, Instytut Niskich Temperatur i Badan Strukturalnych, realizacja projektu badawczego Metody: Spektroskopia ramanowska i podczerwieni październik 2002-luty 2003. Staż naukowy z Politechniki Wrocławskiej.
4. Polska, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, PAN, realizacja projektu badawczego, metoda: Fluorescencja Stanów Ustalonych Wrocław Listopad 2002 - Marzec 2003, Staż naukowy.
5. Republika Czeska, Instytut Chemii Fizycznej, Czeskiej Akademii Nauk w Pradze, realizacja projektu badawczego, metoda: technika relaksacji rozpuszczalnika, kwiecień 2003. Metody: FCS, Korelacyjna Spektroskopia Fluorescencyjna, SR, metoda relaksacji rozpuszczalnika. wspólna publikacja
6. Dania, Instytut Fizyki Uniwersytecie Południowej Danii, realizacja trzech projektów badawczych, metody: mikroskopia kontrastu fazowego i modulacji Hoffmana, techniki elektroformacji, metody mikromanipulacyjne, mikroskopia konfokalna, sierpień 2003 - marzec 2004 , wyjazd w ramach programu Sokrates - Erasmus.
7. Dania, Instytut Fizyki na Uniwersytecie Południowej Danii, realizacja trzech projektów badawczych, Wpływ oddziaływań elektrostatycznych na mechaniczne właściwości błon lipidowych, lipiec 2005.
8. Polska, Grupa Biofizyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków realizacja projektu badawczego, badania na żywych komórkach, kwiecień 2005.
9. Republika Czeska, , Instytut Chemii Fizycznej, Czeskiej Akademii Nauk w Pradze, wyjazd w ramach programu Leonardo, sierpień-październik 2005.
10. Warsztaty dotyczące dyfrakcji neutronowej, Niemcy, Forschungszentrum Juelich, "Neutron scattering course", Wrzesień 2004, finansowane z funduszy Unii Europejskiej, język angielski czas

trwania : 14 dni - 7 dni część teoretyczna - 7 dni, część praktyczna - wykonanie doświadczeń oraz analiza danych z dobozem modelu suma: 80 h

11. Warsztaty dotyczące technik kalorymetrycznych, Szwecja, Sztokholm, firma TA Instruments. 7 dni – praktyczne warsztaty z technik kalorymetrycznych listopad 2007 suma: 32h
12. Szkolenie: "Badanie i ocena materiałów farmaceutycznych metodami analizy termicznej, kalorymetrii i technikami sorpcji" oraz praktyczna szkoła technik pomiarowych IR 1-2 październik 2007 suma: 20 h
13. Międzynarodowe warsztaty 1st International Workshop on Advanced Fluorescence Imaging and Dynamics listopad 17-21 2008 suma: 50 h
14. Warsztaty w zakresie badań rozwojowych substancji farmaceutycznych - wymagania" Kraków luty 2007 suma: 24 h

M. Wykonane ekspertyzy lub inne opracowania na zamówienie

1. **Transfer technologii:** (w oparciu o zgłoszenie patentowe nr PL388134) Borowik T., Przybyło M. Langner M. Opracowanie liposomowej formulacji naproksenu do podaży transdermalnej. Data wdrożenia: I-IV 2009 r. **Miejsce wdrożenia:** C.B.R. Novasome sp. z o.o. (**potwierdzenie w postaci świadectwa pracy oraz zleceń prac w zakresie wdrożenia**)
2. **Transfer Technologii:** (w oparciu o zgłoszenie patentowe PL388134) Borowik T., Przybyło M. Jopek W. Potaczek P. **Transfer technologii wytwarzania liposomowej postaci naproksenu.** Data wdrożenia: V-IX 2009 r. Miejsce wdrożenia: P.F.F. Hasco-Lek (potwierdzenie w postaci świadectwa pracy oraz zleceń prac w zakresie wdrożenia)
3. Koncepcja fizyczna reprezentacji modułów palców zgodnych ze zgłoszeniem patentowym nr P390186 "Układ pomiarowy dla czujników akustomiograficznych do zastosowania w układzie sterowania aktywnej protezy ręki w robotyce" - proteza ręki jest obecnie w fazie prototypowej w zamawiającej firmie. (Potwierdzenie protokołem odbioru)
4. Ekspertyzy w Programie Operacyjnym Innowacyjna Gospodarka 2007 – 2013 (Priorytet 1 „Badania i rozwój nowoczesnych technologii”. Działanie 1.1. „Wsparcie badań naukowych dla budowy gospodarki opartej na wiedzy”. Poddziałanie 1.1.1. „Projekty badawcze z wykorzystaniem metody foresight”). Nr umowy: UDA-POIG.01.01.01-02-011/09-00
5. Ekspertyza dotycząca określenia warunków wytwarzania liposomów w standardach GMP opracowana dla EIT+ (2011)

N. Udział w zespołach eksperckich i konkursowych

1. 2018-2019 Ekspert funduszu ABAN Fund w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój (Działanie 1.3 Poddziałanie 1.3.1 Wsparcie Projektów badawczo-rozwojowych w fazie preseed przez fundusze typu proof of concept – BRIDGE Alfa)
2. 2018 – 2019 Udział w zespole eksperckim, w roli kluczowego koordynatora Urzędu Marszałkowskiego Dolnego Śląska w zakresie opracowania programu konkursowego dla wspólnego

przedsięwzięcia Marszałka Dolnego Śląska oraz Narodowego Centrum Badań i Rozwoju pn. Dolnośląska Strefa Technologii Biomedycznych.

3. Ekspert ds Dolnośląskiej Strategii Innowacji 2030 Urzędu Marszałkowskiego Dolnego Śląska.

O. Recenzowanie projektów międzynarodowych i krajowych

1. Recenzje wniosków grantowych dla Fundacji na rzecz Nauki Czeskiej „The Czech Science Foundation” w latach 2010-2012. Zrecenzowano sześć wniosków grantowych; 2015 – recenzja 4 wniosków grantowych.

P. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych

1. Journal of Physical Chemistry C (2017)

25.04.2019
Przybyło