

Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
ul. Stefanowskiego 4/10
90-924 Łódź



dr inż. Małgorzata Anita Bryszewska

ZAŁĄCZNIK NR 3

AUTOREFERAT

ŁÓDŹ 2019

1. Dane personalne.....	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	2
4. Wskazanie osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego.....	3
A) Tytuł osiągnięcia	3
B) Publikacje lub inne prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	3
C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
C1. Specjacja chemiczna w ekotoksykologii – arsen (B5, B6).....	8
© Zdolność żaby iberyjskiej <i>rana perezi</i> do metabolizowania arsenu (B5)	9
© Zdolność danio pręgowanego (<i>danio rerio</i>) do akumulowania arsenu (B6).....	12
C.2. Specjacja chemiczna w ocenie źródeł biopierwiastka- selen (B4).....	15
C.3. Specjacja chemiczna w konstruowaniu żywności funkcjonalnej – żelazo (B1, B2, B3)....	20
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.....	37

1. DANE PERSONALNE

Imię i nazwisko:	Małgorzata Anita Bryszewska
Miejsce zatrudnienia:	Politechnika Łódzka Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Podstaw Chemii Żywności ul. Stefanowskiego 4/10; 90-924 Łódź
Adres e-mail:	malgorzata.bryszewska@p.lodz.pl

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

Tytuł:	2003. Doktor nauk technicznych w zakresie technologii chemicznej
Afiliacja:	Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Temat:	Biologiczne źródła organicznych form selenu
Promotor	prof. dr hab. inż. Wojciech Ambroziak
Stopień naukowy:	1994. Magister inżynier Biotechnologii
Afiliacja:	Politechnika Łódzka, Wydział Chemii Spożywczej i Biotechnologii
Temat:	Immobilizacja biokatalizatorów na nośnikach zawierających celulozę bakteryjną
Promotor	dr Alina Krystynowicz

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

1.12.2004.- Obecnie	Politechnika Łódzka, Instytut Podstaw Chemii Żywności Adiunkt
01.07.2006- 31.12.2007	Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Química Analítica Badacz doctor (Investigador doctor)
01.12.1994 - 01.12.2004	Politechnika Łódzka, Instytut Podstaw Chemii Żywności Asystent

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 16 ust.2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789) jest cykl publikacji naukowych

A) TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA

Biodostępność wybranych pierwiastków niezbędnych i toksycznych

B) PUBLIKACJE LUB INNE PRACE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

- B1 Bryszewska M.A.**
Comparison study of iron bioaccessibility from dietary supplements and microencapsulated preparations
NUTRIENTS. 2019, 11(2), 273
IF₂₀₁₇ 4,196 IF 5-letni 4,603 MNiSzW₂₀₁₇ 35
- B2 Bryszewska M.A.,** Tomás-Cobos L., Gallego E., Villalba M.P., Rivera D., Taneyo Saa D.L., Gianotti A.
In vitro bioaccessibility and bioavailability of iron from breads fortified with microencapsulated iron.
LWT – FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. 2019, 99, 431-437.
IF₂₀₁₇ 3,129 IF 5-letni 3,455 MNiSzW₂₀₁₇ 40
- B3 Bryszewska M.A.,** Laghi L., Zannoni A., Gianotti A., Barone F., Taneyo Saa D.L., Bacci M.L., Ventrella D., Forni M.
Bioavailability of microencapsulated iron from fortified bread assessed using piglet model.
NUTRIENTS. 2017, 9(3), 272.
IF₂₀₁₇ 4,196 IF 5-letni 4,603 MNiSzW 35
- B4 M. Bryszewska, A. Måge**
Determination of selenium and its compounds in marine organisms
JOURNAL OF TRACE ELEMENTS IN MEDICINE AND BIOLOGY. 2015, 29, 91-98.
IF₂₀₁₅ 2,550 IF 5-letni 2,484 MNiSzW 20
- B5 M. A. Bryszewska, E. Sanz, J. Sanz-Landaluze, R. Muñoz-Olivas, M. E. Ortiz-Santaliestra, C. Cámara**
Evaluation of arsenic biotransformation by Iberian green frog during metamorphosis.
JOURNAL OF ANALYTICAL ATOMIC SPECTROMETRY. 2011, 26, 178-186.
IF₂₀₁₁ 3,220 IF 5-letni 2,966 MNiSzW 40

- B6 **M.A. Bryszewska**, S.E.S. Hannam, R. Muñoz Olivas, C. Camara
Possibility of direct arsenic determination in exposed embryos of zebrafish (*Danio rerio*)
with Zeeman Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry.
SPECTROSCOPY LETTERS. 2009, 42 (6-7), 363-369.
IF₂₀₀₉ 0,585 IF_{5-letni} 0,762 MNiSzW 10

Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączyłam oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualne wkłady w ich powstanie (Załącznik 6).

DANE SCJENTOMETRYCZNE według Web of Science
na dzień 15.03.2019 (*przedstawione zgodnie z rokiem opublikowania*)

- * W przypadku publikacji z 2019, dla których nie określono wskaźników oddziaływania *Impact Factor* za rok opublikowania, wykorzystano punktację za poprzedni rok w którym była opublikowana, zaś punkty MNISW podano za ostatni rok, w którym były opublikowane.
- ** W przypadku publikacji, dla których nie był wyznaczony 5-letni *Impact Factor* do wyliczenia sumarycznego wskaźnika użyłam wskaźnika z roku ukazania się publikacji.

Cyklu publikacji będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego

- 17,876** Sumaryczny *Impact Factor*
- 18,873** Sumaryczny 5-letni *Impact Factor*
- 180** Liczba punktów zgodnie z kryteriami Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego opublikowanymi w komunikacie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych

Wszystkich prac

- 26,704** Sumaryczny *Impact Factor*
- 27,814** Sumaryczny 5-letni *Impact Factor*
- 304** Liczba punktów zgodnie z kryteriami Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego opublikowanymi w komunikacie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych
- 7** Index Hirscha według Web of Science

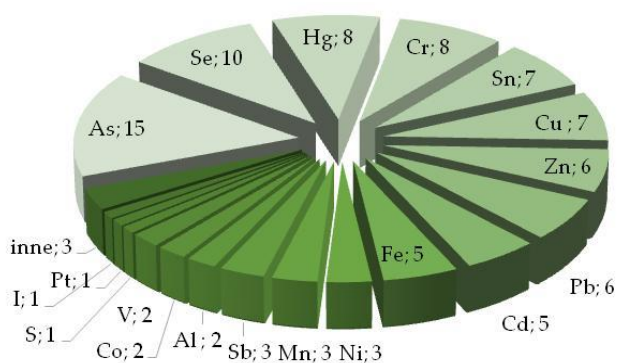
DZIEDZINA: Nauki techniczne

DYSCYPLINA: Biotechnologia

C) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Chemiczne, biologiczne, toksykologiczne i ekologiczne oddziaływanie pierwiastka może być różne w zależności od formy chemicznej, w jakiej on występuje. Zgodnie z definicją przedstawioną przez IUPAC w 2000 roku występowanie danego pierwiastka w różnych postaciach takich jak: jony lub związki chemiczne na różnych stopniach utlenienia oraz w połączeniu z różnymi ligandami określa się terminem „specjacja/ specjacja chemiczna” [1]. Proces identyfikacji i oznaczania różnych form fizycznych i chemicznych, w jakich dany pierwiastek występuje w badanej próbce określa się terminem „analiza specjacyjna”. Oznaczanie form fizycznych i chemicznych pierwiastka oraz ich zawartości ma istotne znaczenie dla wielu dziedzin nauki i obszarów życia. Pozwala na rzeczywiste oszacowanie ryzyka powodowanego

przez pierwiastki, a w zasadzie ich związki, na zdrowie ludzi i środowisko naturalne. Wśród badawczych i praktycznych zastosowań specjacji należy wymienić: badania cykli biochemicznych, badania toksyczności i ekotoksyczności, analitykę kliniczną, kontrolę jakości produktów żywnościowych i farmaceutyków oraz monitorowanie procesów technologicznych. Przedmiotem badania analizy specjacyjnej są zarówno pierwiastki, których



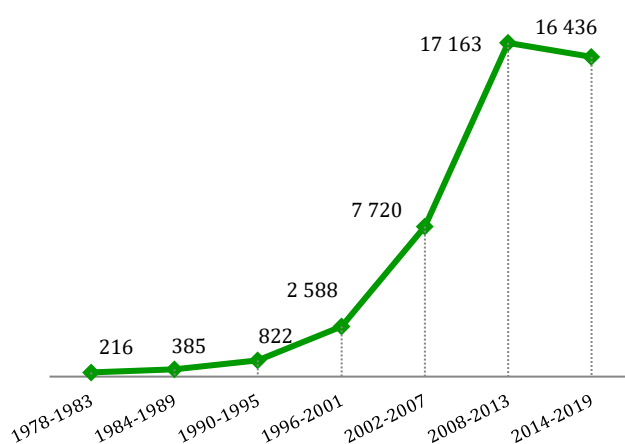
Rysunek 1. Procentowy udział publikacji dotyczących specjacji poszczególnych pierwiastków (EVISA, 2000-2005)
<http://www.speciation.net/Public/Document/2003/09/11/502.html>

toksyczny charakter został udowodniony, jak i biopierwiastki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania flory i fauny, a w konsekwencji i człowieka. Rozpatrując właściwości chemiczne można wyróżnić główne grupy pierwiastków na których skupia się analiza specjacyjna: 1) metale: Al, Sn, Sb, Pb; 2) metale przejściowe: Cr, Ni, Cu, Pt, Hg; 3) metaloidy: As, Se. Na podstawie zestawienia prac opublikowanych w latach 2000-2005, przygotowanego w 2006 roku przez EVISA¹, można wskazać główny nurt badań, w którym znajdowało się pięć pierwiastków (Rys. 1). Niemal 50 % wszystkich publikacji dotyczyło: arsenu, selenu, rtęci, chromu i cyny. Przedmiotem 30 % artykułów było pięć kolejnych: miedź, cynk, ołów, kadm i żelazo. Wszystkie pozostałe pierwiastki znajdowały się w centrum zainteresowania jedynie 20 % publikacji. W późniejszych latach coraz częściej pojawiały się prace dotyczące specjacji innych pierwiastków jak np.: siarka i fosfor, lantanowce lub platynowce.

Niewątpliwie jedno z najważniejszych praktycznych zastosowań badań specjacyjnych znajduje się w obszarze toksykologii. Postęp w zrozumieniu zagrożeń dla zdrowia ludzkiego,

¹ European Virtual Institute for Speciation Analysis

jakie wynikają z narażenia na kontakt z substancjami niebezpiecznymi, znajduje odzwierciedlenie w bardziej szczegółowym prawodawstwie. Agencje regulacyjne rządowe i międzynarodowe na całym świecie, oprócz regulacji określających maksymalne dopuszczalne stężenia pierwiastków, wprowadzają ograniczenia dotyczące ich wyszczególnionych form chemicznych określając dopuszczalne stężenia lub całkowicie zakazując ich użycia. Jednym z pierwszych przykładów takiego dokumentu jest Ramowa Dyrektywa Wodna 2000/60/WE, w której związki tributylocyny zostały zaliczone do priorytetowych substancji niebezpiecznych, których zanieczyszczenia powinny być progresywnie redukowane, natomiast zrzuty, emisje i straty zaprzestane lub stopniowo wyeliminowane. W kolejnych rozporządzeniach zakaz użycia został rozszerzony na organiczne pochodne cyny w systemach przeciwporostowych (EC 782/2003) i następnie w produktach konsumpcyjnych (REACH nr 276/2010). Dyrektywa 98/83/WE z dnia 3 listopada 1998 r. oraz Rozporządzenie Ministra Zdrowia Dz. U. 2007 nr 61 określają maksymalną zawartość chromu(VI) w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Najwyższe dopuszczalne poziomy nieorganicznego arsenu w środkach spożywczych określa Rozporządzenie Komisji (UE) 2015/1006 z dnia 25 czerwca 2015 r. W bliskiej przyszłości można się spodziewać regulacji dotyczących zawartości maksymalnych dopuszczalnych poziomów metylortęci w rybach i pochodnych produktach. Propozycję takiego projektu zawiera raport po 12 sesji FAO/WHO Codex Committee on Contaminants in Foods (lut, 2018).



Rysunek 2. Liczba publikacji zawierających termin „specjacja chemiczna” w kolejnych pięcioleciach.

Źródło: EBSCOhost z 01/02/2019

Analityka specjacyjna jest stosunkowo nową dziedziną badań, jej rozwój rozpoczął się przed czterema dekadami (lata 80, XX wieku). Obecnie stała się bardzo ważnym aspektem współczesnej analizy. Liczba publikacji przedstawiających wyniki badań, w których specjacja chemiczna była stosowana stale i dynamicznie rośnie (Rys. 2). Prześledzenie form chemicznych w jakich pierwiastek występuje w próbkach środowiskowych i biologicznych wymaga dostępu do technik analitycznych umożliwia-

jących jednocześnie rozdział i detekcję na poziomie $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Najczęściej stosowane są techniki łączone, w których do rozdzielania stosuje się metody chromatograficzne (cieczowa, gazowa bądź elektrochromatografia), natomiast detekcja może być przeprowadzona przy użyciu konduktometrów, spektrofлуorymetrów i spektrometrii atomowej i masowej: ICP-AES²,

² Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy- Atomowa spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzaną indukcyjnie.

ESI-MS³, ICP-MS⁴. W badaniach wpływu związków bioaktywnych czy polutantów środowiskowych na organizmy żywe analiza form chemicznych w jakiej występuje pierwiastek musi być uzupełniona poznawaniem sposobów przyswajania, metabolizowania i wykorzystania w organizmie. Ocenę biodostępności i bioprzyswajalności składników pokarmowych i odżywczych oraz toksyczności uzyskuje się w badaniach *in vivo* oraz w badaniach z udziałem ludzi lub zwierząt, które są uważane za organizmy modelowe. Biodostępność określana jest jako ilość lub frakcja składnika odżywczego, która jest uwalniana z matrycy pokarmowej w trakcie trawienia żołądkowo-jelitowego i staje się dostępna do absorpcji [2]. Dostępność biologiczna zazwyczaj oceniana jest z zastosowaniem procedur trawienia *in vitro*, najczęściej w układzie symulującym trawienie żołądkowe i w jelicie cienkim. Modele *in vitro* są ekonomicznie opłacalne, uzyskiwane wyniki są powtarzalne oraz, ogólnie rzecz biorąc, szybkie. Symulacje trawienia obejmują przemiany trawienne w materiał gotowy do asymilacji, wchłaniania przez komórki nabłonka jelitowego. Wyznaczenie proporcji składnika odżywczego, która jest wchłaniana i może być stosowana w normalnych funkcjach organizmu jest podstawą określania bioprzyswajalności tego składnika [3]. Parametr ten opisuje trzy następujące po sobie elementy:

- dostępność; może być bezpośrednia lub powstająca w wyniku trawienia w przewodzie pokarmowym,
- wchłanianie, jako transport przez ścianę jelit,
- metabolizm: wprowadzenie niemetabolizowanej części do centralnego krwioobiegu i jej rozkład w wątrobie.

Badania biodostępności w warunkach *in vitro* stanowią połączenie sztucznych układów trawienia z pomiarami stężeń rozpuszczalnych lub dializowalnych frakcji związków bioaktywnych. Ostatnio te badania są również uzupełniane o testy z liniami komórkowymi [4]. Zatwierdzonym i najczęściej stosowanym modelem komórek nabłonka jelitowego są kultury tkankowe Caco-2. Te pierwotnie pochodzące z ludzkiego gruczolaka okrężnicy komórki w hodowli są poddawane spontanicznemu różnicowaniu w celu utworzenia dobrze spolaryzowanej warstwy wykazującej wiele funkcjonalnych właściwości morfologiczne dojrzałych enterocytów ludzkich [5]. Do badań modelowych predysponuje je również zdolność produkcji enzymów (np. alkalicznej fosfatazy, sacharazy i aminopeptydazy) oraz systemów transportujących substancje ze światła przewodu pokarmowego do krwioobiegu.

Z zagadnieniem specjacji i analizą specjacyjną zetknęłam się w trakcie prac badawczych przedstawionych w rozprawie doktorskiej. Stanowiły one jeden z etapów moich prac, które pozwoliły mi na potwierdzenie wbudowywania selenu do białek kielków roślin. Zagadnienie wydawało mi się bardzo interesujące i aktualne, dlatego też stało się motywacją do dalszych badań.

³ Electrospray Ionisation Mass Spectrometry - Spektrometria mas z jonizacją przez elektrorozpraszanie.

⁴ Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry - Spektrometria mas z plazmą wzbudzaną indukcyjnie.

Przedstawiane do oceny osiągnięcie naukowe jest wynikiem prac badawczych prowadzonych w latach 2006–2018, w których zajmowałam się różnymi aspektami wykorzystania specjacji chemicznej i analizy specjacyjnej wybranych pierwiastków, a w szczególności:

- w ocenie toksyczności substancji zanieczyszczających środowisko w stosunku do wybranych organizmów zwierzęcych i ich potencjalnej przydatności jako bioindykatorów środowiskowych,
- w ocenie produktów pokarmowych jako źródła mikroelementu na podstawie form chemicznych, w których ten pierwiastek w nich występuje,
- w opracowaniu żywności funkcjonalnej o optymalnej bioprzyswajalności biopierwiastka, w którą jest wzbogacana.

Przeprowadzone badania naukowe oraz ich wyniki, opisane szczegółowo w publikacjach, będące podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego, przedstawiłam w autoreferacie, w kolejności chronologicznej.

C.1. Specjacja chemiczna w ekotoksykologii – arsen (B5, B6)

Poszukując możliwości realizacji zainteresowań badawczych skontaktowałam się z profesorem Carmen Cámara z Complutense University w Madrycie (UCM), której zespół prowadził wówczas badania nad specjacją selenu, arsenu i interakcjami selenu z rtęcią. W 2006 r. uzyskałam stypendium z Hiszpańskiego Ministerstwa Edukacji i Nauki i dołączyłam do zespołu prof. Cámara. Zająłam się prześledzeniem przemian jakim podlegał arsen w organizmach żab iberyjskich *Rana perezi* oraz zdolnością embrionów *Danio reio* do akumulowania arsenu ze środowiska.

Arsen jest powszechnie występującym w środowisku naturalnym zanieczyszczeniem, powstającym w efekcie naturalnych procesów, oraz w rezultacie szerokiego przemysłowego wykorzystania jego różnorodnych pochodnych. Związki arsenu stosowane były jako: środki ochrony drewna, herbicydy, pestycydy, farby, farmaceutyki, półprzewodniki, składniki w produkcji szkła, w medycynie do leczenia m.in. malarii, gruźlicy, cukrzycy, syfilisu czy reumatyzmu. Odkrycie w drugiej połowie XX wieku kancerogennego działania As całkowicie odmieniło pogląd o jego użyteczności i poskutkowało niemal całkowitym wycofaniem związków arsenu z użycia. Niekorzystne biologiczne działanie związków arsenu jest bardzo zróżnicowane w zależności od formy specjacyjnej. Dla organizmów żywych najbardziej toksyczne są połączenia nieorganiczne, a w szczególności zawierające arsen trójwartościowy. Nieorganiczne związki zaliczane są do czynników o udowodnionym epidemiologicznie działaniu rakotwórczym. W klasyfikacji czynników i substancji rakotwórczych opracowanym przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC⁵) arseniany(V) i (III) zostały zaliczone do grupy 1, czyli

⁵ International Agency for Research on Cancer

substancji rakotwórczych dla człowieka. Znacznie niższą toksyczność wykazują organiczne arsenozwiązki, dla których ogólnie przyjmuje się, że szkodliwość jest około stukrotnie mniejsza niż połączeń nieorganicznych. Metylowane połączenia arsenu, takie jak kwas monometyloarsenowy (MMA) i kwas dimetyloarsenowy (DMA), wykazują znacznie mniejszą toksyczność i przez IARC zaliczane są do Grupy 2B: "potencjalnie rakotwórcze dla ludzi". Arsenobetaina i niektóre inne organiczne związki arsenu, które nie mogą być metabolizowane w organizmach ludzkich, są uważane za nietoksyczne [6].

Populacja ludzka może być narażona na działanie arsenu głównie poprzez wodę i żywność. Największe ilości arsenu dostarczane są do organizmu wraz z wodą pitną. Zanieczyszczenie wód arsenem jest problemem w wielu rejonach świata, przyjmuje się, że co najmniej 140 milionów ludzi w 50 krajach miało dostęp do wody pitnej zawierającej arsen na poziomie przekraczającym $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (WHO) [7]. Skutki przewlekłej ekspozycji zależą od dawki, czasu, formy chemicznej, drogi narażenia, ale również od genetycznie zróżnicowanej tolerancji osobniczej [8]. Zanieczyszczenie wody arsenem jest problemem powszechnie występującym, dlatego też badanie składu związków arsenu w organizmach wodnych może dostarczyć użytecznych informacji na temat konsekwencji zanieczyszczenia ekosystemów słodkowodnych, jak również przynieść ważne dane toksykologiczne.

- **Zdolność żaby iberyjskiej *Rana perezi* do metabolizowania arsenu (B5⁶)**

Badania wpływu zanieczyszczenia wód powierzchniowych arsenianami(V) na organizmy bytujące w środowisku wodnym przeprowadzone zostały w UCM we współpracy z zespołem na Uniwersytecie w Salamance w ramach projektu finansowanego z Hiszpańskiego Ministerstwa Edukacji i Nauki ⁷.

Żaby uważane są za ważne bioindykatory wykorzystywane do monitorowania problemów chemicznego skażenia środowiska wodnego i lądowego. Przydatność żab do tego rodzaju badań i monitoringu środowiska wynika z ich powszechności występowania, umiejscowienia w łańcuchu pokarmowym oraz wodno-lądowego trybu życia. Płazy są wrażliwe na zmiany jakości wody, ich populacje silnie reagują na zanieczyszczenie gleby i wody różnego rodzaju substancjami zanieczyszczającymi jak: metalami ciężkimi, pestycydami, węglowodorami.

Celem prac była weryfikacja hipotezy o możliwości wykorzystaniu *Rana perezi* jako organizmu bioindykatora, wskazującego na wystąpienie skażenia wód powierzchniowych arsenianami. Następnie, zbadanie zdolności tych płazów do akumulacji arsenu podczas ich ontogenetycznego rozwoju, jak również określenie składu form chemicznych As w organizmach osobników w kolejnych fazach.

⁶ M. A. Bryszewska, E. Sanz, J. Sanz-Landaluze, R. Muñoz-Olivas, M. E. Ortiz-Santaliestra, C. Cámara Evaluation of arsenic biotransformation by Iberian green frog during metamorphosis. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2011, 26, 178-186

⁷ SB2005-0027. Diseños y avances en el tratamiento de muestra para: especiación, extracción, selectiva y estudios de interacción metal(oide)-proteína. Ministerio de Educación y Ciencia

Sto jaj pochodzących od pięciu żab zostało zebranych w Prado de las Pozas (Sierra de Gredos, centralna Hiszpania) i przeniesionych do laboratorium uniwersyteckiego w Salamance, gdzie w kontrolowanych warunkach były hodowane do 72 dnia tj.: do zakończenia proces morfogenetycznego. W sześciu momentach rozwojowych żab, odpowiadających przemianom metamorficznym związanym z formowaniem kończyn i przejściem z całkowicie wodnego do wodno-lądowego trybu życia pobierane były próbki. Dni pozyskiwania prób odpowiadały etapom rozwoju wyróżnionym przez Gossnera: faza 1 (dzień 5) - wylęg; faza 2 (dzień 20) - operculum wytworzone, skrzela zewnętrzne wchłonięte; faza 3 (dzień 45) - pojawiają się kończyny tylne; faza 4 (dzień 55) formowanie się połączeń stawowych; faza 5 (dzień 66) formowanie się kończyn przednich; faza 6 (dzień 72) - ogon wchłonięty, metamorfoza zakończona. W grupach badanych zastosowane zostały dwa poziomy ekspozycji na arsen: 50 mg As(V)·L⁻¹ (stężenie 5 krotnie wyższe w porównaniu z zaleceniami WHO dotyczącymi zawartości arsenianów w wodzie pitnej) oraz 100 mg As(V)·L⁻¹ (stężenie odpowiadające temu, jakie było odnotowywane na terenach skażonych).

W trakcie doświadczenia prowadzona była obserwacja indywidualnego rozwoju badanych osobników *Rana perezi*. Nie zaobserwowaliśmy anomalii, we wszystkich grupach rozwój przebiegał prawidłowo. Śmiertelność zwierząt narażonych na działanie As w wybranym zakresie stężeń nie wynosiła więcej niż 10% (1% LC₅₀) i nie różniła się od grupy kontrolnej.

Po zakończeniu hodowli oznaczyłam całkowitą zawartość As oraz przeprowadziłam analizę składu form chemicznych, w których on występował w grupach osobników ze wszystkich faz rozwojowych. Biorąc pod uwagę cel badania, czyli możliwości wykorzystania żaby iberyjskiej jako bioindykatora, nie prowadziłam oznaczeń dla indywidualnych osobników. Jednorodny materiał uzyskałam poprzez wysuszenie i sproszkowanie całych organizmów żab z poszczególnych grup.

W pierwszym etapie prac oznaczyłam całkowitą zawartość arsenu w próbkach stosując metodę FIA⁸-ICP-MS po uprzedniej ich mineralizacji kwasowej. Oznaczone stężenia pierwiastka w organizmach były wyższe, aniżeli w środowisku hodowlanym i uzależnione od jego dostępności, wskazując na zdolność akumulowania As przez *Rana perezi*. W grupie badanej narażonej na 100 mg As(V)·L⁻¹ zawartości As w organizmach zwierząt była od 1,5 do 2,3 krotnie wyższa, aniżeli w grupie badanej narażonej na 50 mg As(V)·L⁻¹. Ilość akumulowanego As wzrastała do fazy 3 (45 dzień) tj.: do pojawienia się kończyn tylnych, po czym następował systematyczny spadek. Tendencja ta była obserwowana w obu grupach badanych. Relatywna akumulacja wyrażona przez odniesienie stężenia arsenu w organizmach zwierząt do jego stężenia w otaczającym środowisku pokazała, że akumulacja ta nie była wysoka. Wskaźniki bioakumulacji były niskie: od 4 do 34 dla dawki 50 mg As(V)·L⁻¹ i od 3 do 31 dla ekspozycji 100 mg As(V)·L⁻¹. Zatem, nawet w fazie, w której wskaźnik bioakumulacji był najwyższy był on relatywnie niski i zbliżony do opisywanego w literaturze dla ryb.

⁸ Flow Injection Analysis - przepływowa analiza wstrzykowa

Porównując zawartość As w organizmach zwierząt z poszczególnych faz zaobserwowałam silną zależność akumulacji od stadium rozwojowego. Zależność ta może sugerować, że absorpcja As nie była pasywna i że istnieją mechanizmy regulujące pobieranie As zmieniające się wraz ze zmianami morfologicznymi i anatomicznymi.

W kolejnym etapie prac, w którym przeprowadziłam identyfikację i oznaczenie ilościowe związków arsenu, zastosowałam techniki łączone: chromatografię cieczową sprzężoną z ICP-MS. Przed przystąpieniem do analizy specjacyjnej As w próbkach żab przeprowadziłam dobór warunków rozdziału chromatograficznego. Warunki prowadzenia procesu ustaliłam dla wzorców, które wybrałam ze względu na warunki doświadczenia oraz rodzaj próbek i były to:

- 1) arseniany(V) ^{a) b)}
- 2) arseniany(III) (As(III)) ^{b)}
- 3) kwas dimetyloarsenowy (DMA) ^{c)}
- 4) kwas monometyloarsenowy (MMA) ^{c)}
- 5) tlenek trimetyloarsenowy (TMAO) ^{c)}
- 6) arsenobetaina (AsB) ^{c) d)}
- 7) arsenocholine (AsC) ^{c) d)}
- 8) kation tetrymetyloarsenowy (TMA⁺) ^{d)}

^{a)} forma w jakiej As był wprowadzony do środowiska hodowlanego,

^{b)} dominujące formy chemiczne występujące w wodach naturalnych,

^{c)} stwierdzone występowanie w próbkach materiału biologicznego,

^{d)} dominujące formy As występujące w organizmach morskich, zarówno roślinnych (glony), jak i zwierzęcych (ryby, skorupiaki, mięczaki).

Wybrane substancje w roztworach wodnych mają bardzo różny charakter chemiczny, dlatego uzyskanie rozdziału wszystkich wzorców w jednym cyklu chromatograficznym było trudne do uzyskania. Tradycyjnie były stosowane różne rodzaje chromatografii. Związki tworzące w roztworach wodnych aniony (As(III), As(V), MMA, DMA) były rozdzielane za pomocą chromatografii anionowymiennej, natomiast dla tworzących kationy (AsB, AsC, TMA⁺) bardziej odpowiednia była chromatografia kationitowa. Potencjalną możliwością rozdzielania wybranych wzorców dawało połączenie różnych technik. Sprawdziłam możliwość zastosowania trzech rodzajów chromatografii cieczowej:

a) jonowej z tandemowo połączonymi kolumny: Hamilton PRP-X100 i Hamilton PRP-X200,

b) wykluczania w połączeniu z jonową (kolumna: Shodex Asahipak GS-220 HQ)

c) jonowej (kolumna: Dionex IonPac AS7).

Najlepszy rozdzielanie uzyskałam stosując ostatnią z testowanych kolumn. Dobierając składy faz ruchomych i program gradientu uzyskałam dobry rozdziel As(III), As(V), MMA, DMA i AsB. Piki pochodzące od TMAO, AsC i TMA⁺ nie były całkowicie rozdzielone, nakładały się przy linii bazowej. Dlatego, jeżeli analiza z użyciem IonPac AS7 wskazywała na obecność któregoś z tych trzech związków chemicznych, w celu weryfikacji, wykonywałam również rozdzielanie

chromatograficzne z użyciem PRP-X200, kolumny dedykowanej do analizy analitów posiadających ładunek dodatni w roztworze.

Opracowaną metodę rozdziłu zastosowałam do identyfikacji i oceny ilościowej arsenozwiązków w ekstraktach wodnych z prób biologicznych. Dla wszystkich próbek zwierząt zebranych w odpowiednich fazach rozwojowych wyznaczyłam wydajność ekstrakcji określoną jako stosunek całkowitego stężenia arsenu w ekstraktach do całkowitego stężenia arsenu w wejściowym materiale. Oznaczona wydajność ekstrakcji zawierała się w granicach od 65 do 100 %.

Wyniki badań specjacyjnych pokazały, że arseniany(V) pobrane przez żaby ulegały przemianom metabolicznym, przekształcając się w szeroką gamę związków. Skład i stężenie oznaczonych arsenopochodnych był uzależniony od fazy rozwojowej *R. perezi* oraz dawki AsO_4^{3-} w środowisku bytowania. Jon tetrametyloarsenowy był głównym metabolitem identyfikowanym w ekstraktach wodnych, a jego zawartość wynosiła aż do 78,8 % identyfikowanego As. Wydawało się, że metylacja była dominującym sposobem biotransformacji, co znajdowało odzwierciedlenie w stosunkowo wysokich poziomach TMA^+ w końcowych etapach rozwoju. Uzyskane wyniki były zgodne z danymi literaturowymi, według których wewnątrzkomórkowa biotransformacja arsenu zachodzi głównie na drodze metylacji. Zaabsorbowany arsen ulega biometylacji do kwasu metyloarsenowego(III) lub (V), kwasu dimetyloarsenowego(III) lub (V) i trimetyloarsenu [9]. Szczegółowe omówienie wyników analiz specjacyjnych As przedstawiłam w publikacji B5.

Wyniki tych badań dostarczyły wiedzy, której na ogół brakowało w badaniach płazów, a dotyczącej zdolności pobierania i metabolizowania zanieczyszczeń środowiskowych przez osobniki z różnych faz rozwojowych. Stwierdzone różnice w zdolności akumulacji i biotransformacji arsenianów(V) przez *Rana perezi* w trakcie rozwoju ontogenetycznego mogą być użyteczne np.: w ocenie narażenia drapieżników na arsen. W tym przypadku bardziej narażone na ten czynnik toksyczny mogą być te wcześniejsze, larwalne drapieżniki, aniżeli późniejsze żywiące się młodymi osobnikami.

- **Zdolność danio przegowanego (*Danio rerio*) do akumulowania arsenu (B6⁹)**

Kierunek dalszych prac został zainspirowany obserwacjami z badań przeprowadzonych w populacjach ludzkich, pochodzących z różnych części świata, a narażonych na działanie arsenu w zbliżonych dawkach. Porównanie to pokazało, że indywidualna wrażliwość na skażenie wody pitnej arsenem i skutki zdrowotne nim wywołane były bardzo zróżnicowane.

Opracowanie narzędzia analitycznego umożliwiającego określenie zawartości arsenu w indywidualnych organizmach wydawało się nam istotne, ponieważ pozwalało na określenie różnic w pobraniu substancji pomiędzy osobnikami w obrębie grupy i pochodzącymi z różnych serii próbek. Do badania wpływu czynników środowiskowych w warunkach laboratoryjnych

⁹ M.A. Bryszewska, S.E.S. Hannam, R. Muñoz Olivas, C. Camara. Possibility of direct arsenic determination in exposed embryos of zebrafish (*Danio rerio*) with Zeeman. Spectroscopy Letters. 2009, 42 (6-7), 363-369

wybraliśmy embriony danio pręgowanego (*Danio rerio* ang. zebrafish). Ryby te są stosowane jako organizm modelowy z uwagi na podobieństwa rozwoju embrionalnego z wyższymi kręgowcami (włączając człowieka), szybki rozwój, możliwość bezpośredniej obserwacji narządów wewnętrznych we wczesnych etapach rozwoju, ponieważ ciało jest przejrzyste. Ponadto, ich przydatność do naszych badań wynikała z faktu, iż embriony danio są stosunkowo twarde co umożliwiało nam ich przenoszenie i prace z pojedynczymi osobnikami.

Badania przeprowadzone zostały we współpracy z ZF Biolabs w Madrycie, wówczas nowopowstałym (w 2003) przedsiębiorstwem biotechnologicznym, jednym z pierwszych w Europie, specjalizującym się w badaniach z wykorzystaniem *Danio rerio*. W laboratorium embriony były hodowane w środowisku zawierającym $1 \text{ mg As(V)} \cdot \text{L}^{-1}$ przez 24 godziny i następnie w laboratorium UCM przeprowadziliśmy ocenę indywidualnego pobrania arsenu ze środowiska hodowlanego.

Stosowana we wcześniejszych pracach metoda oznaczenia całkowitej zawartości As, była nie odpowiednia do aktualnie prowadzonych badań. Konieczność przeprowadzenia roztwarzania i wiążące się z tym rozcieńczeniem próbki powodowało, że stężenia analitu były poniżej możliwości oznaczenia metodą FIA-ICP-MS. Jako spełniające wymagania tego oznaczenia narzędzie analityczne wybrana została atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją elektrotermiczną (ETAAS¹⁰) w kuwecie grafitowej. Została ona uznana za odpowiednią technikę ze względu na możliwość zastosowania do analizy próbek stałych bez potrzeby wstępnej ich obróbki. Laboratorium UCM, w którym prowadziłam te badania nie pracowało wcześniej z podobnym materiałem, dlatego konieczne było opracowanie metody oznaczania As w embrionach danio i jej walidacja. W celu uzyskania najlepszego sygnału analitycznego dla arsenu przeprowadzona została optymalizacja oznaczenia przy użyciu ETAAS w ekstraktach oraz w niepoddanych wstępnemu przygotowaniu do analizy embrionach ryb. W wykonaniu części eksperymentalnej tych prac uczestniczyła studentka z University of Waterloo w Kanadzie, która pracowała pod moją opieką w trakcie wakacyjnego stażu.

Pierwszym spodziewanym ograniczeniem zastosowania ETAAS do oznaczenia As w matrycy organicznej były silne interferencje powodowane przez matrycę. Powszechnie stosowanym sposobem na przezwycięzenie podobnych zakłóceń analizy jest wprowadzenie do próbki modyfikatorów. W naszych badaniach przetestowaliśmy efektywność wzmocnienia sygnału analitycznego przez dodatek soli palladu, niklu oraz mieszaniny magnezu i ołowiu. Doborowi podlegały zarówno rodzaj modyfikatora, jaki i jego stężenie, które testowaliśmy w zakresie od $0,01$ do $2,00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Najlepsze wyniki dla próbek wstępnie przygotowanych poprzez roztworzenie w kwasach otrzymaliśmy przy zastosowaniu soli Pd w stężeniu od $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. W dalszych badaniach wartość tą przyjął jako minimalną. W oznaczeniach, w których spodziewałam się silniejszych interferencji powodowanych przez matrycę, jak w przypadku próbek, które nie były poddane wstępnej obróbce, zdecydowałam się stosować wyższe stężenia. Oszacowałam, że dodatek $2,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ modyfikatora powinien zapewnić jego wystarczającą ilość.

¹⁰ Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry

Kolejnym krokiem w optymalizacji pomiaru As z użyciem ETAAS było ustalenie parametrów pracy pieca i programu termicznego. Doborowi podlegały temperatura i czas poszczególnych cykli oraz ilość wprowadzanego argonu.

Ostatnim etapem prac metodycznych był dobór wzorca do kalibracji. W celu porównania przygotowano trzy krzywe kalibracyjne z użyciem: As(V), As(III) oraz AsB. Taki dobór związków As pozwolił nam na porównanie i ocenę możliwych różnic między nieorganicznymi i organicznymi połączeniami As. Jako organiczną formę chemiczną wybraliśmy arsenobetainę kierując się wynikami badań, zgodnie z którymi AsB jest głównym związkiem arsenu wykrywanym w liofilizatach ryb. W ten sposób uzyskiwaliśmy podobieństwo matrycy z przewidywanymi próbkami. Ponadto, liofilizat ryb był wykorzystywany w pracy jako materiał odniesienia. Krzywe kalibracyjne nie wykazały różnic w absorbancji pomiędzy wzorcami w zakresie stężeń 4-80 mg As·L⁻¹.

Walidację metody przeprowadziliśmy poprzez porównie wyników oznaczenia zawartości As w dwóch rodzajach prób z zastosowaniem ETAAS i FIA-ICPMS. Do przygotowania próbek użyte były grupy po 5 embrionów. Pierwszy rodzaj próbek stanowiły mineralizaty uzyskane na drodze kwasowego roztwarzania, zaś drugą roztwory po ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami. Wydajność zastosowanych procedur wydzielania analitu z matrycy była porównywalna, nie stwierdziliśmy statystycznie istotnych różnic. Wynik ten czynił ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami korzystniejszą metodą obróbki wstępnej próbki, bowiem była szybsza i nie wymagała stosowania szkodliwych dla środowiska odczynników. W oznaczeniu nie zaobserwowaliśmy zakłóceń wynikających z wprowadzenia matrycy organicznej.

Nadrzędnym celem tych prac było opracowanie metody oznaczania As w pojedynczych embrionach, dlatego też po doborze warunków oznaczania przeprowadziliśmy dobór warunków bezpośredniego wprowadzania embrionu do pieca grafitowego, oraz warunków prowadzenia oznaczenia. Inny rodzaj matrycy spowodował, że ponownie konieczne było wprowadzenie korekty w parametrach pracy pieca. Do ustalenia parametrów oznaczenia w próbce stałej zastosowaliśmy embriony z próby kontrolnej oraz roztwór As(V). W trakcie tych prac metodycznych zaobserwowaliśmy, że po kilku oznaczeniach w piecu grafitowym pozostawał osad węgla. Dlatego, celu poprawy efektywności pirolizy, wprowadziliśmy dodatek czynnika utleniającego. Ostateczna mieszanina reakcyjna składała się z embrionu, 10 µL roztworu soli Pd o stężeniu 2,0 g Pd·L⁻¹, 10 µL 30 % nadtlenku wodoru i 5 µL roztworu As(V) o stężeniu 50 µg As·L⁻¹. W przypadku analizy embrionów z grupy badanej roztwór As(V) zastępowaliśmy wodą.

Manualne wprowadzenie embrionu do kuwety grafitowej wymusiło konieczność zmodyfikowania programu pracy pieca przez wprowadzenie początkowego etapu w temperaturze pokojowej, który umożliwiał wykonanie tej operacji. Wprowadziliśmy również etap wstępnej pirolizy w temperaturze 600 °C w celu całkowitego zmineralizowania próbek z wysoką zawartością węgla.

Uzyskana w optymalnych warunkach granica wykrywalności metody wynosiła 2 ng As·g⁻¹.

Analiza zawartości arsenu w pojedynczych embrionach danio przegowanego rozwijających się przez 24 godziny w środowisku zawierającym $1 \text{ mg As(V)} \cdot \text{L}^{-1}$ pokazał duże zróżnicowanie w zawartości pomiędzy poszczególnymi osobnikami. Średnia zawartość As dla 10 embrionów wynosiła $0,50 \pm 0,15 \text{ ng}$ (RSD = 30 %). Takie duże indywidualne zróżnicowanie akumulacji As wzbudziło wątpliwości, czy zaobserwowane różnice są wynikiem naturalnej osobniczej zmienności w zdolności absorpcji tego pierwiastka, czy możliwą przyczyną były trudności w uzyskaniu powtarzalnych embrionów. Inną możliwą przyczyną była niepowtarzalność umiejscowienia embrionów w piecu grafitowym, w kolejnych cyklach analizy przy manualnym wykonaniu tego etapu. W celu wyjaśnienia tych wątpliwości, w kolejnej partii 10 embrionów danio oznaczenie zawartości As wykonałam metodą FIA-ICP-MS po uprzedniej dezintegracji embrionów z zastosowaniem ultradźwięków. Średnia zawartość As w embrionie oznaczona tą metodą wynosiła $0,30 \pm 0,10 \text{ ng}$ (RSD = 25 %). Analiza statystyczna z zastosowaniem testu F wykazała, że nie było istotnej różnicy między wynikami uzyskanymi z zastosowaniem porównywanych metod. Przyjęliśmy więc, że wysoce prawdopodobne jest, że za zmienność akumulacji arsenu odpowiadają czynniki biologiczne, które mogą mieć wpływ na pobór arsenu oraz jego akumulację.

Opracowana metoda oznaczenia z użyciem ETAAS może być niezwykle przydatnym narzędziem, dzięki skróceniu czasu przygotowania próbki, wyeliminowaniu możliwych strat analitu w trakcie wstępnej obróbki, ograniczeniu zużycia odczynników, jak również jako pozwalające na bezpośrednie oznaczanie pierwiastków w próbce pierwotnej.

Po zakończeniu mojego stażu badania z wykorzystaniem metody były kontynuowane przez zespół prof. Carmen Cámara, a wyniki przedstawione w publikacji: López-Serrano O.A, Sanz-Landaluze J, Muñoz-Olivas R, Guinea J, Cámara C. Zebrafish larvae as a model for the evaluation of inorganic arsenic and tributyltin bioconcentration. Water Res. 2011 Dec 1;45(19):6515-24.

C.2. Specjacja chemiczna w ocenie źródeł biopierwiastka- selen (B4¹¹)

Kontynuację badań nad specjacją chemiczną pierwiastków umożliwił mi grant indywidualny, który uzyskałam w 2009 w ramach programu stypendialnego Funduszu Stypendialnego i Szkoleniowego¹². Celem planowanych badań było przeprowadzenie prac, które pozwoliłyby na określenie rodzaju związków chemicznych, w których był obecny selen, w żywności pochodzenia morskiego. Ryby i owoce morza stanowią istotne, naturalne źródło selenu w diecie. Całkowita jego zawartość na ogół jest bardzo zróżnicowana, w zależności od gatunku, warunków

¹¹ M. Bryszewska, A. Måge. Determination of selenium and its compounds in marine organisms Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2015, 29, 91-98

¹² Fundusz Stypendialny i Szkoleniowy (FSS) działał w ramach mechanizmu finansowego EOG 2009-2014 wspierającego współpracę pomiędzy Polską a państwami-darczyńcami, tworzącymi Europejski Obszar Gospodarczy: Islandią, Liechtensteinem i Norwegią.

bytowności i dostępności pierwiastka w środowisku. Zmienność ta sugerowała zmienny skład form chemicznych selenu w zależności od gatunku oraz od całkowitego stężenia pierwiastka w organizmie. Roczny staż typu postDoc odbyłam w NIFES¹³, w Bergen, w Norwegii. Instytut prowadził badania w ramach programu monitoringu obecności pozostałości leków, nielegalnych i niepożądanych substancji w rybach i innych organizmach morskich. Zbieranie, selekcję i przygotowanie próbek ryb prowadzono również w ramach systemu monitoringu ustanowionego przez Norwegian Food Safety Authority. Oba programy stworzyły mi możliwość pracy z różnymi organizmami pochodzącymi z różnych siedlisk wzdłuż norweskiej linii brzegowej. Ponadto, NIFES dysponował bardzo nowoczesną aparaturą, w tym 3 spektrometrami mas sprzężonym z plazmą wzbudzaną indukcyjnie oraz chromatografami ciekowymi współpracującymi z ICP-MS.

Selen jest pierwiastkiem o bardzo ciekawym i złożonym działaniu biologicznym. W śladowych ilościach jest niezbędny, w wyższych stężeniach może być toksyczny. Niezbędne i zalecane do zachowania dobrostanu organizmów żywych dzienne spożycie (RDA¹⁴) powinno wynosić 55 – 70 µg/dobę dla kobiet i 55 µg/dobę dla mężczyzn. Optymalna dzienna dawka dla osób dorosłych (a zwłaszcza w podeszłym wieku) została oszacowana na 100 µg/dobę. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA¹⁵) za Naukowym Komitetem ds. Żywności (SCF¹⁶) przyjął wartość 300 µg/dzień jako górny tolerowany poziom pobrania dla dorosłych, w tym kobiet w ciąży i karmiących, na podstawie poziomu bez obserwowanego działania niepożądanego (NOAEL¹⁷) wynoszącego 850 µg/dzień dla klinicznej selenozy [10]. Znaczenie selenu dla prawidłowego funkcjonowania i zachowania zdrowia zwierząt i ludzi wynika z faktu, iż jest on obecny jako niezbędny komponent do tworzenia aktywnego centrum enzymów. U ludzi zidentyfikowanych zostało dwadzieścia pięć genów selenobiałek [11]. Spośród tych poznanych selenobiałek funkcja tylko kilku została dotychczas wyjaśniona. Najlepiej poznana aktywność enzymatyczna związana jest działaniem antyoksydacyjnym oraz regulacją hormonów tarczycy. Selenobiałka uczestniczą w wielu procesach komórkowych w tym syntezie dezoksynukleotydów, usuwaniu szkodliwych związków jak: nadtlenek wodoru, nadtlenki lipidowe oraz fosfolipidowe [12].

W żywności dominującą formą, w której Se jest obecny są związki organiczne, z wyjątkiem grzybów oraz niektórych warzyw hodowanych na glebach o wysokiej zawartości tego pierwiastka [13]. Bardzo specyficzne i wyjątkowe związki zostały zidentyfikowane w roślinach z rodziny Brassica i Allium, które mają zdolność akumulowania selenu. Rośliny te mogą przekształcać Se w niebiałkowe selenoaminokwasy: selenometyloselenocysteinę i γ-glutamilo-Selenometyloselenocysteinę [14]. W najczęściej spożywanych produktach żywnościowych główną formą chemiczną jest selenometionina (SeMet). W rybach oznaczone zostały seleniany(VI), ale ich

¹³ National Institute of Nutrition and Seafood Research, obecnie Institute of Marine Research

¹⁴ Recommended Dietary Allowance

¹⁵ European Food Safety Authority

¹⁶ Scientific Committee on Food

¹⁷ NOAL (No-observed-adverse-effect-level) największa dawka substancji obcej, witaminy lub składnika mineralnego, która przy dłuższym stosowaniu nie powoduje niekorzystnych objawów zdrowotnych.

zawartość wydaje się być zależna od gatunku [15], [16]. W ogólnym ujęciu owoce morza mogą być bogatym źródłem selenu, jednakże jego przyswajalność z tych źródeł była określana jako dobra lub niska. W raporcie Amerykańskiej Rady ds. Żywności i Żywienia przedstawionym w 2000 r., przyjmuje się SeMet jako źródło selenu z ponad 90 % możliwością zaabsorbowania. Około 100 % selenianu(VI) jest wchłaniane z przewodu, ale znaczna część jest wydalana z moczem. Seleniany(IV) są absorbowane tylko w około 50 %, ale są lepiej zatrzymane w organizmie niż selenian(VI) [17].

Prace badawcze nad specją chemiczną selenu w organizmach morskich rozpoczęłam od doboru postępowania analitycznego, które pozwoliło na wyizolowanie z materiału biologicznego selenozwiązków i następnie ich identyfikację. Jako substancje wzorcowe do badań wybrałam sześć związków chemicznych selenu najczęściej występujących w produktach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego: 1) selenotlenek selenometioniny (SeOMet), 2) selenometyloselenocysteinę (SeMetCys), 3) selenocystynę (SeCys₂), 4) selenometioninę (SeMet), 5) seleniany(IV) (Se(IV)), 6) seleniany(VI) (Se(VI)). Dobór metody chromatograficznego rozdzielu wybranych związków selenu nastroczał trudności, ze względu na różne ich właściwości chemiczne w roztworach wodnych. W wybranej grupie wzorców znalazły się zarówno połączenia Se nieorganiczne, jak i organiczne, elektrolity słabe i mocne, dysocjujące w roztworach wodnych z utworzeniem anionów oraz kationów. Różnice w właściwościach chemicznych wymuszały zastosowanie metod opierających się na różnego rodzaju mechanizmach rozdzielu. Zazwyczaj chromatografia anionowymienienna stosowana była do oznaczenia zawartości Se(IV) oraz Se(VI), zaś kationowymienienna do oznaczenia SeMet. Organiczne formy chemiczne Se jak SeCys₂ najczęściej identyfikowane były z wykorzystaniem chromatografii w układzie faz odwróconych. Analiza prowadzona w taki sposób jest czasochłonna, ale przede wszystkim wiąże się z dużym ryzykiem zmiany składu selenozwiązków, czy proporcji różnych form chemicznych obecnych w pierwotnej próbce w czasie przechowywania prób oczekujących na badanie składu. Zastosowanie chromatografii par jonowych w odwróconym układzie faz stwarzało możliwość rozdzielu i oznaczenia wszystkich wybranych wzorców w trakcie jednego rozdzielu chromatograficznego. Możliwość zastosowania tego rodzaju chromatografii testowałam z użyciem dwóch kolumn: XDB-C18, Hamilton oraz XBridge C18 Waters. Warunki chromatograficznej separacji ustaliłam poprzez dobór składu faz ruchomych, ich pH oraz rodzaju i stężenia przeciwjonu. Sprawdziłam efektywność rozdzielu z użyciem trietyloaminy (TEA) i wodorotlenku tetrabutylamonowego (TBA) jako reagenta tworzącego pary jonowe. Uzyskałam rozdziel wszystkich wybranych selenozwiązków wzorcowych stosując TBA jako przeciwjon w układzie metanol-woda. Metoda nie dawała jednak zadowalającej elucji wszystkich związków wzorcowych. Se(VI) wymywane były z kolumny jako ostatnie, kilkanaście minut po Se(IV), a pik im odpowiadający był poszerzony. Przyspieszenie procesu sorpcji-desorpcji tych cząsteczek uzyskałam wprowadzając rozdziel w układzie z gradientem. Siła elucyjna drugiej fazy ruchomej została zwiększona przez zastąpienie fosforanu(V) amonu siarczanem(VI) amonu, w stężeniu dwukrotnie wyższym. Ponadto, faza ruchoma B nie zawierała TBA. Granice wykrywalności w opracowanych warunkach rozdzielu chromatograficznego z użyciem kolumny

Water XBridge C18 z gradientem dla Se(VI), SeMet, Se(IV), SeMetCys, SeCys₂ i SeOMet wynosiły odpowiednio: 0,30 ng·mL⁻¹, 0,43 ng·mL⁻¹, 0,54 ng·mL⁻¹, 0,55 ng·mL⁻¹, 0,57 ng·mL⁻¹ i 0,72 ng·mL⁻¹.

Kolejnym etapem prac było opracowanie procedury ekstrakcji selenozwiązków z matrycy biologicznej. W pracach tych szczególną uwagę skupiłam na dążeniu do uzyskania maksymalnie wysokiego stopnia ekstrakcji selenozwiązków przy zastosowaniu metod, które nie powinny powodować zmian składu ilościowego i rodzaju poszczególnych form chemicznych. W czasie kiedy prowadziłam te badania nie było dostępnych handlowych materiałów certyfikowanych do analizy specjacyjnej, dlatego jako materiały odniesienia, w doborze metody przygotowania prób do analizy, zastosowałam 3 dostępne w laboratorium NIFES materiały: 1) DORM-3, który jest certyfikowanym materiałem referencyjnym dla oznaczenia całkowitej zawartości pierwiastków, będący białkiem ryb; 2) sproszkowany dorsz: materiał został uzyskany przez wysuszenie i sproszkowanie całej ryby w tym skóry i kości; 3) mieszanka pokarmowa stosowana na farmach rybnych.

Biorąc pod uwagę rodzaj związków, których mogłam oczekiwać, zastosowałam dwa rodzaje ekstrakcji tj.: do buforu fosforanowego o stężeniu 1 mM, oraz hydrolizę enzymatyczną z udziałem proteazy z *Streptomyces griseus* EC 3.4.24.31. W celach porównawczych przeprowadziłam również ekstrakcję wspomaganą mikrofalami jako metodę, która mogła przyspieszyć procedurę przygotowywania prób do analizy specjacyjnej. Jednakże, w żadnym z porównywanych układów nie okazała się ona efektywniejsza, dlatego w badaniach stosowałam tylko proteolizę.

Oznaczenie całkowitej zawartości i analizę specjacyjną selenu wykonałam dla próbek:

- ryb: dorsz atlantycki, halibut grenlandzki, łosoś atlantycki (hodowlany), śledź atlantycki,
- skorupiaków: krab (szczypce), kraby (głowotulów), przegrzebek, omułki,
- planktonu: *Kalamus*, *Euphasis superba*.

Najmniejsze wahania w całkowitej zawartości selenu pomiędzy próbkami zaobserwowałam dla śledzia atlantyckiego. W 24 przeanalizowanych próbkach stężenie Se wahało się w granicach od 1,82 do 3,2 mg·kg⁻¹ s.m. ($2,37 \pm 0,28$ mg Se·kg⁻¹ s.m.). Taka zmienność całkowitej zawartości Se wydawała się stosunkowo mała, gdyż ryby złowione były w różnych latach i pochodziły z różnych miejsc połowu. Największą zmienność w całkowitej zawartości Se obserwowałam w próbkach omułka, która zawierała się w granicach od 1,45 do 8,23 mg·kg⁻¹ s.m. i halibuta od 0,98 do 5,56 mg·kg⁻¹ s.m. ($2,33 \pm 1,01$ mg·kg⁻¹ s.m.). Najniższą zawartość Se stwierdziłam w próbkach łososa hodowlanego od 0,17 do 0,33 mg·kg⁻¹ s.m.

Oznaczone zawartości selenu mogą być wykorzystane do oszacowania stopnia, w jakim dany produkt pokrywa dzienne zapotrzebowania na ten mikroelement. Rozważając, zgodną z rekomendacjami, 80 g porcję ryby dostarczyłaby średnio selenu w ilości odpowiadającej dziennemu zapotrzebowaniu, jeżeli byłby to śledź, bądź halibut. W przypadku dorsza byłaby to ilość odpowiadająca połowie rekomendowanego spożycia. Najbardziej ubogim pod tym względem źródłem byłby łosoś hodowlany. W kolejnych latach problem ten był dyskutowany w publikacjach, ich autorzy sugerowali potrzebę suplementacji pasz roślinnych dla mięsożernych

ryb morskich w celu dostarczenia mikroelementu w ilości niezbędnej do pokrycia zapotrzebowania i zapewnienia prawidłowego rozwoju [18],[19]. W Unii Europejskiej na podstawie Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) nr 121/2014 pasze dla wszystkich gatunków zwierząt mogą być wzbogacane selenometioniną (np. przez dodatek drożdży selenizowanych)¹⁸.

W kolejnym etapie prac oznaczyłam zawartość Se w ekstraktach do buforu i w ten sposób określiłam jaką frakcja z ogólnej puli Se w próbkach jest obecna w postaci niezwiązanej, dostępnej do ekstrakcji bez destrukcji matrycy. W próbkach ryb jedynie od około 8 do 16 % Se znajdowało się w postaci związków, które nie były związane trwale z matrycą. W próbkach skorupiaków morskich i planktonu udział tych związków był wyższy, od 27 do aż 42,5 %. Takie postępowanie analityczne pozwoliło na wydzielenie z matrycy tylko części selenozwiązków sugerując, że pozostały Se jest obecny w formie selenoaminokwasów. Proteoliza przy użyciu pronazy pozwoliła na uzyskanie wydajności ekstrakcji blisko 100 % dla próbek z filetów łososia, przegrzebków i 80 % z dorsza atlantyckiego. Od 69 do 79 % selenu zostało wydzielone z próbek planktonu morskiego i skorupiaków morskich, z wyjątkiem przegrzebków.

Analizę specyjną selenozwiązków wyizolowanych z próbek przeprowadziłam w uprzednio opracowanych warunkach chromatograficznego rozdzielania z detekcją za pomocą ICP-MS. Skład selenozwiązków w hydrolizatach z organizmów należących do planktonu morskiego, wybranych skorupiaków, w paszach stosowanych na farmach rybnych, a także w wybranych gatunkach ryb był bardzo zróżnicowany, zarówno pod względem ich rodzaju jak i ilości. Dominującą pochodną zidentyfikowaną w ekstraktach z ryb oraz w próbkach rybiego pokarmu była selenometionina. W hydrolizatach z planktonu morskiego i skorupiaków stanowiła ona tylko 12 %. W większości analizowanych hydrolizatów obserwowałam pozytywną korelację pomiędzy całkowitą zawartością SeMet i ogólnym stężeniem Se. Ciekawym wyjątkiem był halibut, co prawda istniała silna pozytywna korelacja pomiędzy zawartością Se a stężeniem selenometioniny (współczynnik Pearson, $r = 0,97$), jednakże łączne stężenie selenu było ujemnie skorelowane ze względnym procentowym udziałem tego aminokwasu ($r = 0,87$). Wraz ze wzrostem całkowitej zawartości Se wzrastał udział procentowy selenianów(IV), sugerując istnienie mechanizmu regulacji wbudowywania selenometioniny do białek. Wysoka zawartość SeMet w rybach jest korzystna z żywieniowych względów, ponieważ formy organiczne są łatwiej przyswajane i efektywniej wpływają na ogólny status pierwiastka w organizmie ludzkim. Utrzymanie odpowiedniego poziomu Se zapewnia, że będą syntetyzowane w wymaganym stężeniu wszystkie naturalne selenobiałka niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów zwierzęcych [20], [21].

Szczegółową analizę zidentyfikowanych związków Se przedstawiałam w publikacji B4. Pełna identyfikacja selenozwiązków nie była możliwa, ze względu na brak odpowiednich wzorców.

¹⁸ Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) NR 121/2014 z dnia 7 lutego 2014 r. dotyczące zezwolenia na stosowanie L-selenometioniny jako dodatku paszowego dla wszystkich gatunków zwierząt (Dz.U.UE.L.2014.39.53)

Uzyskane wyniki mogą być pomocne w opracowywaniu zaleceń dotyczących racjonalnego żywienia tj. zapewniającego odpowiednią ilość selenu. Wysoką zawartość selenometioniny w rybach pozwala uważać je za dobre źródło Se w żywieniu człowieka. Obecność niezidentyfikowanych związków chemicznych selenu wskazuje na konieczność prowadzenia dalszych badań.

C.3. Specjacja chemiczna w konstruowaniu żywności funkcjonalnej – żelazo (B1¹⁹, B2²⁰, B3²¹)

Analiza specjacyjna znajduje również zastosowanie w technologii żywności, w konstruowaniu produktów, w taki sposób aby cechowały się możliwie najwyższą biodostępnością składników aktywnych. W moich pracach badawczych wykorzystywałam specjację i analizę specjacyjną do oceny przyswajalności żelaza z pieczywa wzbogaconego w ten mikroelement.

Ten etap prac zainicjowany został przez Andrea Gianotti z Uniwersytetu w Bolonii, który w lutym 2012 skontaktował się ze mną i przedstawił mi propozycję pracy w zespole przygotowującym projekt badawczy, którego celem było opracowanie dwóch rodzajów pieczywa funkcjonalnego. Pierwszym z planowanych efektów badań miało być pieczywo wzbogacane w żelazo wprowadzone w postaci o potwierdzonej wysokiej bioprzyswajalności. Drugim planowanym produktem miało być pieczywo zawierające dodatek samopszy - prazboża wyróżniającego się zawartością bioaktywnych składników. Andrea Gianotti zaproponował mi udział w pracach, w powstającym zespole, po zapoznaniu się z moimi publikacjami, na podstawie których uznał, że moje doświadczenie z wzbogacaniem żywności w selen²² oraz w analizie specjacyjnej może być przydatne w tym projekcie. Zgodnie z wstępnym założeniem moja rola w tych pracach miała być związana z analizą form chemicznych żelaza na wszystkich etapach prac prowadzących do otrzymania pieczywa wzbogaconego w żelazo i następnie w badaniach jego biodostępności i bioprzyswajalności. Uczestniczyłam w całym procesie tworzenia wniosku, a jako lider jednego z pakietów pracy byłam odpowiedzialna za jego zaplanowanie i opracowanie. Prace związane z przygotowaniem wniosku trwały dziewięć miesięcy. W kwietniu 2013, wniosek uzyskał akceptację w pierwszej fazie oceny i zostaliśmy zaproszeni przez Agencję Wykonawczą ds. Badań Naukowych (REA²³) do negocjacji finansowych. Uczestniczyłam w tym spotkaniu jako przedstawiciel Politechniki Łódzkiej, jednego z siedmiu partnerów w konsorcjum. Przeszliśmy pomyślnie cały proces oceny oraz konsultacji i w listopadzie rozpoczęliśmy realizację projektu Bake4Fun²⁴. W skład konsorcjum projektowego wchodziły: Uniwersytet w Bolonii (Włochy); instytut badawczy: Centrer Tecnológico AINIA w Walencji (Hiszpania), Politechnika Łódzka oraz z trzy przedsiębiorstwa:

¹⁹ Nutrients; 2019, 11(2), 273; 1-14

²⁰ LWT – Food Science and Technology; 2019, Vol. 99, 431-437

²¹ Nutrients. 2017, 9(3), 272

²² Publikacje przedstawione w pkt. 5 „Żywność wzbogacona w selen”.

²³ The Research Executive Agency

²⁴ Innovative biotechnological solutions for the production of new bakery functional foods

Emilio Pena Sa* EPSA z Walencji (Hiszpania); Prometeo Srl Urbino (Włochy); Piekarnia VINI w Rogoźniku (Polska).

W serii 3 publikacji przedstawiłam wyniki prac prowadzących do otrzymania pieczywa wzbogaconego w mikrokapsułkowane żelazo oraz ocenę biodostępności i bioprzyswajalności tego biopierwiastka z opracowanego produktu. Wybór przedmiotu badań i rodzaju produktu żywnościowego wynikały z potrzeby stworzenia alternatywnego do suplementacji rozwiązania problemu niedoboru żelaza. Jego niedobory są najczęściej występującymi zaburzeniem odżywiania na świecie, spotykanymi powszechnie zarówno w krajach uprzemysłowionych, jak i rozwijających się. Szacuje się, że 60 % ludności świata cierpi na niedobór żelaza. Powszechnym problemem są również niedobory cynku, jodu i seleniu, na które cierpi odpowiednio 33 %, 30 % i 15 % ludzi na świecie [17],[22]. Dane te pokazują, że niedobór żelaza i niedokrwistość z niedoboru żelaza dotyczą więcej ludzi niż jakikolwiek inny, a zatem stanowią stan zagrożenia zdrowia publicznego w proporcjach epidemii. W skali całego świata niedobory mikroelementów wynikają przede wszystkim z niedostatecznej podaży żywności. Natomiast w krajach o stosunkowo dużej podaży żywności, w tym i w Polsce, problemem może być występowanie niedoborów utajonych. W grupie takiego ryzyka wymienia się przede wszystkim kobiety w wieku rozrodczym i ciężarne, osoby starsze a także dzieci i młodzież oraz osoby o dużej aktywności fizycznej, z zaburzeniami wchłaniania, nadużywające alkohol. W rozwiniętych społeczeństwach dochodzą również przyczyny wynikające ze stosowania profilaktycznych diet ograniczających ogólne spożycie żywności, diet wykluczających (np. wegetariańskiej), bazujących tylko na jednej specyficznej grupie produktów.

Wybierając produkt, który będzie wzbogacany przyjmuje się, że powinien on być spożywany regularnie w zbliżonych ilościach, preferencyjnie jako stały składnik codziennej diety. Takim produktem jest pieczywo, dlatego też jest ono często wybierane jako nośnik składnika bioaktywnego, uzupełnianego w diecie.

Metabolizm żelaza w organizmach ludzi jest bardzo specyficzny, jego charakterystyczną cechą jest brak fizjologicznego szlaku usuwania pierwiastka z organizmu. W związku z czym obieg Fe w organizmie człowieka dorosłego odbywa się w niemal cyklu zamkniętym. Wyjątkami są: cykliczny ubytek żelaza wraz z krwią występujący u kobiet w wieku rozrodczym oraz niewielkie straty powstające wraz z złuszczeniem się komórek naskórka i nabłonka jelitowego. Uzupełnianie strat odbywa się drogą pokarmową poprzez wchłanianie żelaza z jelita cienkiego. Intensywność absorpcji Fe podlega bardzo ścisłemu mechanizmowi regulacji. Źródła pokarmowe zawierają dwa rodzaje żelaza: hemowe oraz niehemowe, przy czym każde z nich ma inny i specyficzny mechanizm transportu. W przenoszeniu Fe niehemowego ze światła jelita do wnętrza enterocytów pośredniczy transporter metali dwuwartościowych 1 (DMT1) [23],[24]. DMT1 transportuje wybiórczo tylko jony Fe^{2+} , dlatego Fe^{3+} , które są dominującą w dwunastnicy formą żelaza, muszą być uprzednio zredukowane. W reakcji redukcji pośredniczy cytochrom b (DCYTB), lub inne czynniki redukujące jak kwas askorbinowy [25]. Pobrane przez enterocyty żelazo nie jest bezpośrednio przekazywane do obiegu, jest przechowywane w ferrytynie

i w zależności od zapotrzebowania organizmu, może być przekazane do obiegu ogólnoustrojowego lub tracone wraz z obumierającymi komórkami enterocytów. Kontrola wchłaniania żelaza jest regulowana przez hepcydynę, hormon wydzielany przez wątrobę [26],[27]. W przekazaniu przez basalną błonę enterocytów pośredniczy białko transportowe, ferroportyna znana także pod nazwą IREG1²⁵ (białko transportujące żelazo) i oksydaza żelaza: hefestyna [28],[29]. Wchłanianie żelaza jest regulowane nie tylko przez czynniki fizjologiczne, ale również przez czynniki odżywcze. Adsorpcja Fe może być zwiększona przez jednoczesne przyjmowanie witaminy C, białka zwierzęcego [30],[31]. Natomiast, składniki dietetyczne, takie jak kwas fitowy, związki fenolowe i wapń mają negatywny wpływ i zmniejszają wchłanianie żelaza [32],[33].

Prace badawcze rozpoczęliśmy od przygotowania preparatów mikrokapsułkowanego żelaza. Dobór metody otrzymywania (suszenie rozpyłowe, zestalenie rozpyłowe) i materiałów powlekających przeprowadzone zostały przez zespół z AINIA. Testowaliśmy przydatność kilku materiałów jako nośników, w których zamykane były związki żelaza: utwardzony olej palmowy, skrobie modyfikowane, maltodekstryny, guma arabska i chitozan. Najlepsze parametry technologiczne preparatu mikrokapsułkowanego żelaza uzyskaliśmy w wariacie ze skrobią modyfikowaną jako nośnikiem i suszeniem rozpyłowym, jako metodą kapsułkowania [34]. Jako źródło żelaza zastosowane zostały: siarczan(VI) żelaza(II) oraz mleczan żelaza(II). Przy wyborze związków Fe kierowaliśmy się zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia, która w rekomendowanych źródłach żelaza do celów wzbogacania żywności umieściła m.in. siarczan(VI) żelaza(II). Uwzględniliśmy również fakt, że FeSO_4 jest często stosowany jako związek referencyjny w badaniach porównawczych biodostępności i bioprzyswajalności żelaza. Natomiast mleczan żelaza(II) wybraliśmy ze względu na jego rozpuszczalność w wodzie, wysoką względną biodostępność (67 %), względnie niski koszt i stabilność termiczną. Przygotowaliśmy dwie wersje każdego z preparatów: bez oraz wzbogacone w 25 % dodatek witaminy C. W otrzymanych preparatach mikrokapsulek oznaczyłam całkowitą zawartość żelaza, która zawierała się granicach od 4,49 do 11,28 mg·100 g⁻¹.

Morfologię mikrokapsulek oceniałam na podstawie zdjęć wykonanych skaningowym mikroskopem elektronowym²⁶. Powierzchnia otrzymanych mikrokapsulek była charakterystyczna dla preparatów wytwarzanych metodą suszenia rozpyłowego. Częsteczki miały typowy dla tej metody otrzymywania amorficzny kształt i wklęsłości na powierzchni powstające w wyniku szybkiego odparowania wody. Średnia wielkość cząstek (d_{50}) mikrokapsulek określona za pomocą lasera dyfrakcyjnego była mniejsza niż 80 μm i zawierała się w granicach 38,3 - 75,5 μm . Rozkład cząsteczek był jednomodalny, o słabej rozpiętości, z wyjątkiem mikrokapsulek zawierających siarczan(VI) żelaza(II), w którym to przypadku był

²⁵ Iron RegulatedTransporter-1

²⁶ Szczegółowe omówienie wyników przedstawionych w tej części zawiera publikacja B1 (Nutrients; 2019, 11(2), 273)

dwumodalny. Wyniki były zadowalające a dzięki uzyskanym rozmiarom mikrokapsułki mogą mieć szeroki zakres zastosowań. Jednym z potencjalnych zastosowań może być wzbogacanie mąki. Cząstki o tych wymiarach z łatwością mogłyby przejść przez sita o wielkości porów odpowiadających średnicy 150 μm , które są powszechnie stosowane w przemyśle młynarskim.

W kolejnym etapie charakterystyki preparatów zawierających mikrokapsułki przeprowadziłam analizę widm FTIR, celem, której była ocena potencjalnych interakcji pomiędzy solami żelaza a witaminą C i/lub materiałem nośnika (modyfikowaną skrobią) oraz charakterystyka tych oddziaływań. Analiza widm potwierdziła, że wszystkie komponenty rdzenia mikrokapsulek zostały skutecznie zamknięte w materiale nośnika. Widma trzech mikrokapsulek zachowały wiele pasm absorpcji przypisywanych jego składnikom. Natomiast, w widmie mikrokapsulek zbudowanych z mleczanu żelaza(II) i witaminy C widoczne były zmiany pasm w stosunku do widm komponentów sugerujące, że w wyniku interakcji pomiędzy witaminą C i mleczanem żelaza(II) zaszła reakcja wymiany i faktyczną formą chemiczną w jakiej Fe występowało w tym preparacie był askorbinian żelaza(II). Takie zmiany w składzie sugerował również fioletowo-brązowy kolor tego preparatu, odbiegający od pozostałych, które były mleczno-zielone.

Znajomość całkowitej zawartości żelaza była punktem początkowym w ocenie mikrokapsulek jako potencjalnego źródła mikroelementu w diecie człowieka. Liczne badania opisane w literaturze pokazały, że zaledwie niewielka frakcja Fe z dziennej racji pokarmowej jest przyswajana. W przypadku źródeł niehemowych szacuje się, że jest to maksymalnie kilkanaście procent. Do precyzyjnej oceny źródła składnika odżywczego stosowane są: biodostępność i bioprzyswajalność.

Ocenę biodostępności²⁷ żelaza przeprowadziliśmy w dwóch eksperymentach:

- 1) trawienie wzbogaconego w Fe pieczywa w automatycznym symulatorze trawienia,
- 2) trawienie mikrokapsulek w układzie *in vitro* wraz z produktami spożywczymi.

Taki sposób postępowania umożliwił ocenę wpływu czynników pokarmowych na potencjalną dostępność Fe do absorpcji z układu pokarmowego. W produktach pokarmowych mogą znajdować się substancje zarówno zwiększające przyswajanie żelaza, jak i ją zmniejszające. Głównym inhibitorem wchłaniania żelaza są fityniany, przede wszystkim kwas fitowy, którego źródłem jest pieczywo. Czynnikiemami zwiększającymi przyswajalność Fe są m.in.: witamina C i białka zwierzęce [30],[31]. W eksperymencie *in vitro* symulującym trawienie w układzie pokarmowym człowieka sprawdziłam wpływ obecności składników, które wchodziły w skład pieczywa pszenne białe i kanapki śniadaniowej, na bioprzyswajalność żelaza (B1). W skład kanapki wchodziły pieczywo, masło, sałata lodowa i szynka gotowana. Taki skład „kanapki” przyjąłam wychodząc z założenia, że suplementy diety są najczęściej przyjmowane rano wraz z pierwszym posiłkiem, który w naszej kulturze często stanowi kanapka. Ponadto, zawierała ona

²⁷ Pojęcie to jest różnie definiowane w literaturze, przyjęliśmy, że jest to część związku, który jest uwolniony z matrycy pokarmowej w przewodzie pokarmowym i który w ten sposób staje się dostępny do wchłaniania z przewodu pokarmowego [2].

produkty należące do obu grup czynników wpływających na biodostępność: inhibitory i czynniki zwiększające przyswajanie żelaza. Równolegle dla celów porównawczych trawieniu poddałam „kanapkę” wraz z suplementami diety zawierającymi te same formy chemiczne żelaza, jakie znajdowały się w mikrokapsułkach oraz witaminę C. Badania przeprowadziłam w warunkach imitujących trawienie żołądkowe ($\dot{Z}$) oraz dwustopniowe żołądkowo-jelitowe ($\dot{Z}$ -J). W eksperymencie kontrolnym (bez dodatku produktów spożywczych) zaobserwowałam zmniejszenie zawartości żelaza w frakcjach rozpuszczalnych oddzielonych po trawieniu $\dot{Z}$ -J, w stosunku do frakcji $\dot{Z}$. Prawdopodobną przyczyną było wytrącanie się wodorotlenku żelaza(III). Zmiana kwasowości środowiska (z 2,0 do 6,8-7,0) spowodowała wzrost stężenia jonów wodorotlenkowych do wartości wystarczająco wysokiej, aby przekroczyć iloczyn rozpuszczalności wodorotlenku żelaza(III) ($6 \cdot 10^{-38}$) i prawdopodobnie osad tego wodorotlenku wytrącał się z roztworu. W warunkach doświadczenia stężenia jonów Fe^{2+} i OH^- były zbyt niskie, aby mógł być przekroczony iloczyn rozpuszczalności wodorotlenku żelaza(II). Wnioskowanie takie potwierdziło porównanie zawartości Fe w frakcjach pochodzących z wariantów eksperymentów, w których wprowadziłam ten sam związek żelaza, ale różniły się one obecnością witaminy C. Przeciwdziałanie utlenianiu i zachowanie żelaza w formie dwuwartościowej powodowało zwiększenie jego zawartości we frakcji rozpuszczalnej. Wpływ obecności przeciwutleniacza na utrzymanie Fe w formie rozpuszczalnej potwierdzała również zbliżona zawartości Fe w rozpuszczalnych frakcjach po trawieniu w obu układach ($\dot{Z}$, $\dot{Z}$ -J) niezależnie od tego czy żelazo pochodziło z mikrokapsułek, czy suplementów diety.

W większości rozpuszczalnych frakcji uzyskanych po trawieniu z matrycą pokarmową zawartość Fe była wyższa, jeżeli Fe pochodziło z mikrokapsułek, aniżeli w odpowiednich frakcjach otrzymanych po trawieniu z suplementami diety. Wyniki te były zgodne z oczekiwaniami. Nośnik, jakim była zmodyfikowana skrobia stanowił barierę ograniczającą możliwość interakcji między jonami żelaza i czynnikami je kompleksującymi obecnymi w żywności lub uwalnianymi z niej w trakcie trawienia.

Obecność witaminy C w suplementach diety, w większości wariantów, nie miała statystycznie istotnego wpływu na zawartość żelaza w frakcjach rozpuszczalnych otrzymanych w trawieniach bez dodatku żywności w porównaniu z frakcjami pochodzącymi z wariantów, w których stosowane były wzorce $FeSO_4$ i $Fe(C_2H_4OHCOO)_2$. W przeciwieństwie do suplementów, w frakcjach po trawieniu z mikrokapsułkami zaobserwowałam wpływ dodatku przeciwutleniacza i był on pozytywny.

Wprowadzenie matrycy organicznej miało istotny wpływ na zawartość Fe w obu rozpuszczalnych frakcjach $\dot{Z}$ i $\dot{Z}$ -J. Wyniki sugerują, że Fe z obu rodzajów jego źródeł zostało unieruchomione na tych matrycach pokarmowych i w konsekwencji stało się rozpuszczone tylko w ograniczonym stopniu. Stężenie Fe w frakcjach po trawieniu $\dot{Z}$ w obecności matrycy organicznej, w postaci chleba, było niższe lub zbliżone do tego jakie zostało oznaczone w próbkach po trawieniu z „kanapką”.

Dostępność żelaza do absorpcji z suplementów diety oszacowana na podstawie jego zawartości w frakcjach rozpuszczalnych uzyskanych po 2 i 4 godzinnym trawieniu była

znacznie niższa, aniżeli wynikałoby to z wyliczenia na podstawie całkowitej zawartości pierwiastka w preparacie. Unieruchomienie żelaza w postaci trudnorozpuszczalnego wodorotlenku, lub kompleksów ze składnikami pokarmowymi może istotnie zmniejszyć dostępność żelaza do absorpcji z przewodu pokarmowego. Po trawieniu jedna tabletką suplementu diety zawierającego mleczan żelaza(II) może dostarczyć około 56 % żelaza zalecanego dla mężczyzn i 31 % zalecanego dla kobiet, zaś jeżeli suplement zawiera siarczan(VI) żelaza(II) może dostarczyć Fe w ilości odpowiadającej 25 % RDA dla mężczyzn i 14 % RDA dla kobiet. Dzielne zapotrzebowanie najbardziej efektywnie może być wypełnione przez mikrokapsułki zawierające siarczan(VI) żelaza(II) i witaminę C przy nieobecności matrycy żywnościowej.

Dla wszystkich frakcji rozpuszczalnych otrzymanych po trawieniu w układach Ż i Ż-J mikrokapsułek oraz suplementów diety bez lub z produktami żywieniowymi wyliczyłam współczynnik BF²⁸. W publikacji przedstawiłam wartości współczynników dla frakcji Ż-J, jako tych, z których w warunkach rzeczywistych zachodzi wchłanianie. BF wyznaczone dla frakcji po trawieniu układzie Ż wynosiły do 87 %. W większości wariantów kontynuacja trawienia i zmiana warunków związane były z obniżeniem BF. Szczególnie dużą zmianę wskaźnika zaobserwowałam w wariancie, w którym Fe było wprowadzone w formie mikrokapsułowatego mleczanu żelaza(II), bowiem aż do 12,8 %. Obniżenie BF w frakcjach pochodzących z trawienia mikrokapsułek było statycznie istotne, jeżeli preparat zawierał witaminę C. Takiego wpływu jednak nie zaobserwowałam dla suplementów diety. Bioprzyswajalność żelaza z preparatu zawierającego siarczan(VI) żelaza(II) i witaminę C nie różniła się od uzyskanej dla FeSO₄ i była o połowę niższa, aniżeli oznaczona w frakcjach otrzymanych po trawieniu mikrokapsułek zawierających samą sól żelaza i witaminę C.

Obecność matrycy pokarmowej w układzie trawienia nie wpływała na wartości współczynników BF oznaczonych w frakcjach żołądkowo-jelitowych uzyskanych po trawieniu suplementów diety niezależnie od tego czy było to pieczywo, czy „kanapka”. Współczynniki te były niższe od analogicznych otrzymanych w frakcjach po trawieniach z mikrokapsułkami i różnica ta była statystycznie istotna. Istotny wpływ dodatku żywności mogłam zaobserwować w frakcjach po trawieniu z mikrokapsułkami. Niższe wartości współczynników BF prawdopodobnie wynikały z kompleksowania jonów żelaza przez kwas fitowy pochodzący z pieczywa. Obserwacja ta była zgodna z oczekiwaniami i danymi literaturowymi [35]. W zastosowanym pieczywie pszennym zawartość kwasu fitowego mieściła się w wartościach średnich dla zastosowanego typu mąk pszennych. Kombinacja czynnika zwiększającego biodostępność żelaza (mięso) i inhibitora (kwasy fitynowe) wpłynęła na zwiększenie współczynnika BF, jednakże zmiana ta nie była statystycznie istotna, jedynym wyjątkiem był preparat mikrokapsułowatego siarczanu(VI) żelaza(II).

²⁸ Bioprzyswajalna frakcja (BF) = $\frac{\text{Zawartość jonowego żelaza w frakcjach po trawieniu } [\mu\text{g}]}{\text{Całkowita ilość żelaza wprowadzona } [\mu\text{g}]} \times 100\%$

Porównanie współczynników BF, określających frakcję bioprzyswajalną w roztworach po trawieniu suplementów diety i mikrokapsulek pokazało, że nie było statystycznie istotnych różnic pomiędzy formami chemicznymi w których Fe było wprowadzane tj.: pomiędzy siarczanami(VI) żelaza(II) i mleczanami żelaza(II). Statystycznie istotne różnice obserwowalam wówczas, gdy porównalam biodostępność Fe z mikrokapsulek niezawierających i zawierających witaminę C. Zgodnie z założeniami i oczekiwaniem obecność przeciwutleniacza zapobiegała utlenianiu żelaza i jego wytrącaniu w postaci trudnorozpuszczalnego wodorotlenku ($\text{Fe}(\text{OH})_3$). Pozytywny wpływ witaminy C zaobserwowałam również po trawieniu preparatów wraz z chlebem.

Nie zaobserwowałam różnic w biodostępności Fe z frakcji rozpuszczalnych uzyskanych po trawieniu mikrokapsulek i suplementu z mleczanem żelaza(II) w zależności od obecności „kanapki”. Statystycznie istotnie niższa wartość BF była w przypadku trawienia suplementu diety zawierającego FeSO_4 . Wyniki te są zgodne z uzyskanymi w doświadczeniach z komórkami Caco-2²⁹.

Absorpcja żelaza z przewodu pokarmowego jest ściśle uzależniona od jego stopnia utlenienia. Wymaganą do związania z białkiem nośnikowym DMT1 formą chemiczną żelaza jest Fe^{2+} . Zatem do określenia potencjalnej dostępności oprócz oznaczenia zawartości żelaza w frakcjach rozpuszczalnych po trawieniu istotne jest poznanie udziału procentowego jonów dwuwartościowych. Stężenie tego jonu oznaczyłam w frakcjach rozpuszczalnych otrzymanych ze wszystkich wariantów trawienia żołądkowego a jego zawartość wahała się od kilkunastu do blisko 100 %. Dalsze trawienie w warunkach odpowiadających panującym w jelicie spowodowało całkowite jego utlenienie w przypadku trawienia suplementów diety i mikrokapsulek zawierających FeSO_4 niezależnie od tego czy trawienie prowadzone było w obecności pieczywa, czy „kanapki”. W pozostałych wariantach trawienia udział formy dwuwartościowej po trawieniu Ż-J był do 30%. Nie stwierdziłam statystycznie istotnych różnic w zawartości jonów żelaza dwuwartościowego w zależności od rodzaju matrycy pokarmowej.

Specjacja form chemicznych (Fe^{2+} i Fe^{3+}) pokazała, że tylko w przypadku preparatów mikrokapsułkowanego żelaza po 4 godzinnym trawieniu w obecności matrycy pokarmowej pozostawało ono w formie dwuwartościowej, bezpośrednio dostępnej do absorpcji i uznawanej za lepiej bioprzyswajalną. Uzyskane wyniki wskazują, że w badaniach biodostępności żelaza, należy przeprowadzić analizę specjacji w celu uniknięcia rozważania jonów żelaza trójwartościowego, które nie są przenoszone przez błonę jelitową i dlatego mogą nie być bezpośrednio bioakceptowalne. Nieuwzględnienie analizy specjacyjnej w badaniach może prowadzić do zawyżonej oceny biodostępności.

Preparaty mikrokapsułkowanego żelaza w zamyśle projektu i ich opracowania miały stanowić dodatki do żywności, dlatego też w kolejnym etapie prac przygotowaliśmy pieczywo

²⁹ Wyniki przedstawione w publikacji B2 - LWT – Food Science and Technology; 2019, Vol. 99, 431-437

wzbogacone w mikroapsułkowane żelazo. Ocenę biodostępności Fe i szczegółowy opis wyników badań przedstawiłam w publikacji B2.

Mieszanka mąki pszennej i jednego z czterech testowanych preparatów mikroapsulek przygotowana została przez EPSA w warunkach i na urządzeniach stosowanych w przemyśle. Chleby zostały wyprodukowane zgodnie z procedurą opracowaną na Uniwersytecie Bolońskim (UNIBO). Ciasta na pieczywo zostały przygotowane stosując dwa rodzaje fermentacji: przy udziale drożdży oraz na zakwasie. W procesie wytworzenia chleba na zakwasie wykorzystano drożdże prasowane i bakterie kwasu mlekowego pochodzące z kolekcji Department of Agricultural and Food Science and Technology (DISTAL) Uniwersytetu Bolońskiego i były to: *Lactobacillus plantarum* (98a), *Lactobacillus sanfranciscensis* (BB12) i *Lactobacillus brevis* (3BHI). Przygotowaliśmy dziesięć wariantów chlebów eksperymentalnych, w tym osiem wzbogaconych w żelazo (stosując dwa rodzaje fermentacji i cztery rodzaje mikroapsulek) oraz dwa rodzaje pieczywa kontrolnego. W otrzymanym pieczywie oznaczyłam całkowitą zawartość Fe i była ona zbliżona we wszystkich rodzajach wzbogaconych chlebów, ze średnią zawartością $25,36 \pm 2,11$ mg Fe $\cdot$ 100 g⁻¹. Wyjątek stanowiły chleby zawierające mikroapsułkowany siarczan(VI) żelaza(II), dla których średnia zawartość żelaza była niższa i wynosiła $16,92 \pm 1,56$ mg $\cdot$ 100 g⁻¹. Dla chlebów kontrolnych przeprowadziłam analizę składu i oznaczyłam: wilgotność, zawartości: tłuszczu, węglowodanów ogółem, białka, popiołu i błonnika pokarmowego.

Symulację trawienia chlebów przeprowadziliśmy w układzie trawienia imitującym przewód pokarmowy, będącym wielokomorowym dynamicznym systemem, w którym enzymy trawienne i elektrolity wprowadzane są w sposób ciągły, sterowany komputerowo. Symulator ten opracowany został w AINIA, Centro Tecnológico. Parametry trawienia dobierane są zawsze swoiście i właściwie do rodzaju trawionego produktu pokarmowego. Cały proces dynamicznego trawienia żołądkowo-jelitowego przeprowadziliśmy w temperaturze 37 °C przy braku dostępu światła i w warunkach beztlenowych, uzyskanych poprzez wprowadzenie azotu do układu. Po trawieniu Ż-J w symulatorze oznaczałam zawartość żelaza w frakcjach rozpuszczalnych. Wyznaczone współczynniki biodostępności Fe wahały się w szerokim zakresie od 35,99 % do 99,31 %. Najwyższą zawartość jonowego żelaza oznaczyłam w roztworach po trawieniu pieczywa fermentowanego z użyciem drożdży wzbogaconego preparatami: siarczanu(VI) żelaza(II) (BF = 95,22%) i następnie mleczanu żelaza(II) (BF = 99,31%), nie zawierającymi dodatku witaminy C. W zależności od zastosowanego rodzaju fermentacji biodostępność żelaza różniła się, a różnica ta była statystycznie istotna, przy czym pieczywo na zakwasie cechowała mniejsza biodostępność. Wyniki te były sprzeczne z przedstawianymi w literaturze dla produktów wzbogacanych w żelazo nieapsułkowane. Różnica w dostępności żelaza obserwowana w naszych badaniach i w opisanych w literaturze wynika prawdopodobnie z ograniczenia oddziaływania Fe z kwasami fitowymi na tyle, że te oddziaływania przestały być czynnikiem krytycznym w dostępności żelaza. Możliwość interakcji pomiędzy jonami żelaza a chelatem była ograniczona barierą utworzoną przez nośniki mikroapsulek i tworzenie połączenia, związku kompleksowego Fe-kwas fitowy zachodziło w znacznie mniejszym zakresie, bądź też nie zachodziło.

Oznaczenia całkowitej zawartości żelaza w frakcjach rozpuszczalnych oddzielonych po trawieniach wykazały, że żelazo było uwalniane z mikrokapsulek do roztworu. Wyniki analizy specyjnej pokazały, że Fe^{2+} było utleniane częściowo lub nawet całkowicie. Jony Fe^{2+} oznaczyłam prawie wyłącznie w frakcji rozpuszczalnej po trawieniu chleba fermentowanego z użyciem drożdży. W roztworach po trawieniu pieczywa na zakwasie oznaczyłam Fe^{3+} , z jednym wyjątkiem, którym były frakcje po trawieniu pieczywa wzbogaconego w mikrokapsułki zawierające FeSO_4 , gdzie obecne były obie formy Fe. Wydaje się, że zmiany chemiczne i fizyczne w chlebie spowodowane fermentacją z udziałem kultur mieszanych, drożdżowo-bakteryjnych wytworzyły środowisko sprzyjające utlenieniu żelaza w większym stopniu. Niezależnie od rodzaju fermentacji nie zaobserwowałam wpływu witaminy C na stopień w jakim jony żelaza ulegały utlenianiu. **Obecność żelaza w frakcji rozpuszczalnej po trawieniu pozwala sądzić, że mikrokapsułki nie ulegały degradacji w procesie produkcji pieczywa, ani też trawienia w żołądku. Degradacja mikrokapsulek i uwalnianie Fe następowało dopiero w jelicie.**

W kolejnym etapie oceny bioprzyswajalności żelaza z pieczywa wzbogaconego poprzez dodatek mikrokapsulek przeprowadziliśmy symulację wchłaniania Fe z frakcji rozpuszczalnych otrzymanych po trawieniu w automatycznym symulatorze z zastosowaniem kultur tkankowych - Caco-2. Ta część badań została przeprowadzona przez zespół z AINIA. W badaniach nad transportem transnabłonkowym frakcje rozpuszczalne uzyskane po trawieniu chlebów podane zostały na powierzchnię nabłonka utworzonego przez monowarstwę komórek. W roztworze z komory górnej (apikalnej) oraz z komory dolnej (bazolateralnej) oznaczyłam zawartość żelaza całkowitego oraz zawartość jonów żelaza dwuwartościowego i trójwartościowego. Procentowy udział żelaza, który został oznaczony w komorze bazolateralnej i efektywności transportu nie wykazała statystyczne istotnych różnic pomiędzy typem fermentacji zastosowanym do przygotowania pieczywa ($p > 0,05$). Również nie stwierdziłam różnic pomiędzy źródłami żelaza (FeSO_4 vs. $\text{Fe}(\text{C}_2\text{H}_4\text{OHCOO})_2$). Proces przemieszczania niehemowego żelaza przez modelową warstwę enterocytów prześledziliśmy również na podstawie markerów transportu żelaza DMT1 i IREG1. Ekspresja mRNA DMT1, jak również IREG1 nie wykazały różnic statystycznie istotnych pomiędzy rodzajem źródła żelaza i rodzajem fermentacji użytej do przygotowania pieczywa.

Ostatnim etapem oceny pieczywa wzbogaconego w żelazo poprzez dodatek mikrokapsulek było wyznaczenie bioprzyswajalności żelaza w warunkach *in vivo*. Do doświadczenia żywieniowego wybraliśmy prosięta z uwagi na powszechnie występującą u młodych zwierząt anemię. Niedobór żelaza u kilkudniowych prosiąt wynika z niewielkiego naturalnego zapasu żelaza, z którym się rodzą i który po 2-3 dniach zostaje wyczerpany. Dodatkowo, zawartość żelaza w mleku loch jest niewystarczająca do uzupełnienia zapotrzebowania i bardzo szybko niedobory przechodzą w anemię. Do badania wybraliśmy 24 komercyjne mieszańce (Large White Landrace Duroc), prosięta urodzone w jednostce ASA (DIMEVET, UNIBO). Pięć dni po urodzeniu zwierzęta zostały losowo przypisane do czterech grup ($n = 6$). Zwierzęta jednej z grup otrzymały domięśniową suplementację żelaza (IM), którą stosuje się rutynowo w hodowli trzody (CB-G4).

Podczas pierwszych 14 dni życia, prosięta były karmione wyłącznie mlekiem matki. Następnie otrzymywały pokarm mieszany mleko i chleb. Po odstawieniu, począwszy od 44 do 51 dnia były karmione wyłącznie chlebem eksperymentalnym. Dwie grupy zwierząt były karmione chlebami wzbogacanym w żelazo, w tym jedna grupa była karmiona chlebem wzbogaconym poprzez dodatek mikrokapsułkowanego żelaza (FeMB-G1). Drugiej grupie podawaliśmy chleb zawierający równoważną ilość skrobi modyfikowanej, kwasu askorbinowego i siarczynu(VI) żelaza(II) jaka była zawarta w dodatku preparatu mikrokapsulek, w postaci pojedynczych związków (FeSB-G2). Pozostałe dwie grupy będące kontrolnymi jadły chleb bez wzbogacenia w Fe (kontrolny). W ostatniej grupie (CB-G4) były zwierzęta, które w piątym dniu życia otrzymały dożylną suplementację.

Chleby zostały przygotowane według receptury i procedury opracowanej na Uniwersytecie w Bolonii. Opierając się na wynikach wcześniejszych badań wybraliśmy chleby przygotowane na drodze fermentacji z udziałem drożdży oraz preparat mikrokapsułkowanego siarczynu(VI) żelaza(II) i witaminy C. Mieszanke białej mąki pszennej (typ 650) i wybranych mikrokapsulek przygotował zespół z EPSA. Zawartość żelaza w wzbogaczonych chlebach wynosiła 21 mg/100 g⁻¹ (mokrej masy) i była dziesięciokrotnie wyższa, aniżeli w pieczywie kontrolnym. W chlebach eksperymentalnych, w reakcji z Ferene-S, potwierdziłam obecność jonów żelaza dwuwartościowego.

Porównanie masy zwierząt przed i po doświadczeniu żywieniowym pokazało, że u prosiąt z grupy, która otrzymała dożylną suplementację Fe przyrost masy ciała był większy, niż u prosiąt ze wszystkich pozostałych grup i różnica ta utrzymywała się po zakończeniu doświadczenia. W trakcie doświadczenia żywieniowego pobieraliśmy krew i odchody (kał i mocz). Próbkę krwi pobraliśmy w dniu 5, 44 i 51, zaś odchodów w dniach 44 i 51. W 51 dniu, po eutanazji, pobraliśmy próbki moczu, tkanek, treść pokarmową oraz przewody pokarmowe, które następnie zostały rozdzielone na części anatomiczne. We wszystkich tych próbkach oznaczyłam całkowitą zawartość żelaza.

Parametry morfologii krwi: hematokryt (HCT), hemoglobina (Hb) i krwinki czerwone (RBC) wykazywały statystycznie istotny wzrost w grupach, które otrzymywały chleb wzbogacony żelazem (niezależnie od tego czy było to pieczywo z dodatkiem żelaza mikrokapsułkowanego czy nie) w porównaniu do prosiąt skarmianych pieczywem kontrolnym. Na początku doświadczenia żywieniowego grupa FeSB-G2 była klasyfikowana jako z anemią, natomiast po tygodniu wzbogacania wykazywała jedynie niedokrwistość graniczną. Wpływ spożywania pieczywa wzbogaconego mikrokapsułkowanym żelazem na Hb nie był tak wyraźny jak niekapsułkowanego FeSO₄, chociaż nie było statystycznie istotnej różnicy pomiędzy postaciami w jakich Fe było podawane ($p > 0,05$). Całkowita zawartość żelaza w surowicy była bardzo zróżnicowana u poszczególnych osobników. Jednakże, mimo tej dużej indywidualnej zmienności zaobserwowaliśmy różnice w średniej wartości parametru pomiędzy grupami. Poziomy żelaza w grupach suplementowanych doustnie (FeMB-G1 i FeSB-G2) obniżyły się, natomiast pozostały stabilne w grupach żywionych chlebem kontrolnym (CB-G3 i CB-G4). Parametrem bezpośrednio związany z zastosowaną suplementacją wydaje się być stężenie gamma-glutamylotransferazy

(GGT). Wzrost GGT zaobserwowaliśmy u prosiąt ze wszystkich grupach, które otrzymały Fe w formie eksperymentalnych chlebów, a także IM.

Nie zaobserwowaliśmy wpływu różnych rodzajów pieczywa na mRNA hepcydyny (HAMP) w wątrobie oraz na IREG1 i DMT1 w dwunastnicy. Również, nie stwierdziliśmy statystycznie istotnych różnic między grupami pod względem ilości ferrytyny oznaczonej w próbkach osocza. Ten brak istotnych różnic może wynikać ze zbyt krótkiego czasu trwania doświadczenia żywieniowego.

Suplementacja doustna żelazem w postaci mikrokapsułek lub FeSO_4 spowodowała statystycznie istotny wzrost zawartości żelaza w wątrobie, odpowiednio o 51,6 % i 53,9 % w stosunku do grupy CB-G3.

Zawartość żelaza w sercach i wątrobach (narządach najczęściej dotkniętych przeciążeniem żelazem) prosiąt, którym zwiększyliśmy dzienne spożycie żelaza podając wzbogacane pieczywo (FeMB-1 lub FeSB-2), była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną CB-G3 ($p < 0,05$), ale nie osiągnęła poziomu oznaczonego u prosiąt, które otrzymały suplementację domięśniową.

Nie stwierdziliśmy statystycznych istotnych różnic w zawartości żelaza w śledzionach zwierząt z doustną suplementacją w stosunku do grupy kontrolnej. Bardzo duże różnice w zawartości Fe w kale poszczególnych osobników nie pozwoliły na wskazanie różnic pomiędzy grupami. Porównując zawartości Fe w kale poszczególnych osobników w dniach 44 i 51 zauważyliśmy, że wzbogacenie diety spowodowało nawet dwukrotne zwiększenie wydalania żelaza.

Konsekwencją obecności składnika egzogenego w pożywieniu może być wytworzenie się stanu zapalnego. W celu prześledzenia ewentualnych zmian, jakie zaszły w środowisku jelitowym prosiąt z różnych grup doświadczalnych, zbadaliśmy metabolom kału zebranego na początku i na końcu okresu podawania wzbogaconego pieczywa. Stwierdziliśmy obecność sześćdziesięciu sześciu cząsteczek, należących głównie do aminokwasów, krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i kwasów organicznych. Piętnaście wykrytych sygnałów pochodziło od niezidentyfikowanych molekuł. Podanie FeSO_4 spowodowało znaczny ($p < 0,05$) wzrost zróżnicowania metabolom. Natomiast grupy FeMB-G1 , CB-G3 i CB-G4 nie wykazywały różnic statystycznych pomiędzy P44 i P51, co sugeruje, że suplementacja przez podawanie mikrokapsułkowanego żelaza miała łagodniejszy wpływ na mikrobiotę jelitową i metabolom niż siarczanem(VI) żelaza(II).

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć naukowych przedstawionych do oceny:

1. Opracowanie metody rozdziału chromatograficznego ośmiu związków arsenu identyfikowanych w próbkach pochodzenia środowiskowego i biologicznego.
2. Wykazanie, że żaby *Rana perezi*:
 - a) nie mogą być rozpatrywane jako bioindykator skażenia środowiska wodnego arsenianami(V) w stężeniach do 100 mg As(V)·L⁻¹. Podwyższenie zawartości arsenu w środowisku, do poziomu dziesięciokrotnie wyższego od zalecanego przez WHO dla wód przeznaczonych do spożycia dla ludzi, nie miało istotnego wpływu na śmiertelność, czy rozwój ontogenetyczny, co sugeruje, że zwierzęta te są stosunkowo odporne na działanie arsenianów(V),
 - b) w trakcie całego cyklu ontogenetycznego wykazują zdolność absorbowania arsenu ze środowiska, w zakresie zależnym od stężenie substancji w otoczeniu, ale wskaźniki bioakumulacji są niskie,
 - c) akumulują arsenu ze środowiska hodowlanego, a jej poziom jest silnie uzależniony od fazy rozwojowej. Najsilniejszą tendencję do akumulowania arsenu wykazują zwierzęta będące w środkowych fazach cyklu metamorficznego,
 - d) metabolizują arseniany(V) na drodze metylacji, głównie do kationu tetrametyloarsenowego, czemu towarzyszy powstanie wielu produktów pośrednich. Przebieg tego procesu jest zróżnicowany w kolejnych stadiach metamorfozy.
3. Opracowanie metody oznaczenia zawartości arsenu w próbkach stałych z użyciem ETAAS, której zastosowanie do oceny zdolności embrionów *Danio reiro* do pobieraniu arsenianów(V) z środowiska hodowla pokazało duże osobnicze zróżnicowanie w akumulacji pierwiastka po pierwszych 24 godzinach rozwoju osobniczego (30 %).
4. Opracowanie metody chromatograficznego rozdziału sześciu selenozwiązków najczęściej identyfikowanych w różnego rodzaju próbkach biologicznych i jej zastosowanie do oznaczenia składu selenozwiązków w wybranych rybach (dorsz atlantycki, halibut grenlandzki, łosoś atlantycki, śledź atlantycki) skorupiakach (kraby, przegrzebek, omułki), planktonie (*Kalamus*, *Euphasis superba*).
5. Na podstawie oznaczonego składu selenozwiązków wykazanie, że ryby mogą być źródłem dobrze przyswajalnego selenu w diecie człowieka.
6. Wskazanie potrzeby wzbogacania w selen pasz dla łososia hodowlanego. Konsekwencjami utrzymania niezmiennego składu karmy może być:
 - a) niewystarczająca dla zachowania prawidłowego rozwoju tych ryb podaż Se w organizmie,
 - b) łosoś hodowany pozostanie ubogim źródłem Se w diecie człowieka w porównaniu z innymi gatunkami ryb.

7. Wykazanie, że mikrokapsułkowanie w skrobi modyfikowanej jest skutecznym sposobem zwiększenia dostępności żelaza do transportu przez enterocyty na skutek tworzenia bariery minimalizującej jego interakcje ze składnikami matrycy pokarmowej.
8. Dowiedzenie, że wzbogacanie pieczywa poprzez wprowadzenie dodatku preparatów mikrokapsułkowanych soli żelaza(II) jest efektywną metodą wzbogacania w ten biopierwiastek. Podawanie chleba wzbogaconego mikrokapsułkowanym siarczanem(VI) żelaza(II) zapewniło skuteczne leczenie niedokrwistości u prosiąt.
9. Wskazanie potrzeby uzupełnienia oceny biodostępności żelaza o analizę specjacyjną i określenie udziału formy dwuwartościowej.

Najważniejsze konferencje, na których prezentowane były wyniki badań przedstawionych w osiągnięciu

1. Bryszewska Anita Małgorzata, Monica Forni; Maria Laura Bacci; Andrea Gianotti; María del Mar Sanchez
Functional bread for the prevention of iron-deficiency
INTERNATIONAL CONFERENCE ON NUTRACEUTICALS AND FUNCTIONAL FOODS.
Kalamata. Grecja. 07-09/10/ 2016

Poster prezentowany na konferencji został otrzymał nagrodę „Best Poster Award” ufundowaną przez Springer Nature.
2. Bryszewska, Małgorzata; Paz Villalba, M; Tomas, Lidia; Gallego, Elisa; Viadel, Blanca; Gianotti, Andrea; Luisa Llin, Maria; del Mar Sanchez, Maria; Rivera Daniel; Rychel, Liliana
Functional bread enriched with microencapsulated iron
EUROPEAN NUTRITION CONFERENCE (FENS); 12TH CONFERENCE,
Berlin. Niemcy. 20 – 23/10/2015
3. M.P. Villalba, L. Tomás-Cobos, J. Daniel Rivera, M. Sanchez, M. Llin, D.L. Taneyo Saa , A. Bordoni, A. Gianotti, M.A. Bryszewska
BAKE4FUN A success story of Research for SMEs benefit
THE INTERDEPARTMENTAL CENTRE FOR AGRI-FOOD INDUSTRIAL RESEARCH (CIRI)
Cesena. Włochy. 12/10/ 2015
4. M.P. Villalba, B. Viadel, E. Gallego, L. Tomás-Cobos, J. Daniel Rivera, M. Sanchez, M. Llin, D.L. Taneyo Saa , A. Bordoni, A. Gianotti, M.A. Bryszewska
In vitro evaluation of iron bioaccessibility in microencapsulated iron-enriched breads.
4TH INTERNATIONAL CONFERENCE OF FOOD DIGESTION
Neapol. Włochy. 17-19/03/2015
5. Małgorzata Anita Bryszewska, M.E. Ortiz-Santaliestra, C. Cámara
Ocena zdolności pobierania i metabolizowania arsenu przez organizmy modelowe: żaba

Rana perezi i embriony *Danio reiro*
NOWE TREŚDY W TOKSYKOLOGII. PIERWIASTKI TOKSYCZNE I NIEZBĘDNE
Łódź; 07-09/10/2013

6. Małgorzata A. Bryszewska, A. Måge
Selenium and selenium compounds in marine organisms
SELENIUM 2013;
Berlin. Niemcy. 14-18/09/2013
7. M.A. Bryszewska, J. K. Øygard, K. Julshamn, A. Måge
"From Feed to Fish".
9TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SELENIUM IN BIOLOGY AND MEDICINE.
Kyoto, Japan. 31.05-04.06. 2010
8. M.A. Bryszewska, S. E. Hannam, R. Muñoz Olivas, C. Cámara
„Accumulation and Biotransformation of Arsenic by Embryos of Zebrafish (*Danio reiro*).
9TH EUROPEAN BIOLOGICAL INORGANIC CHEMISTRY CONFERENCE.
Wrocław, 02-06/ 09/ 2008
9. M.A. Bryszewska, E. Sanz, M. Ortiz Santaliestra, R. Muñoz-Olivas, C. Cámara.
Arsenic accumulation and transformation during *Rana perezi* metamorphosis process.
IX INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF ANALYTICAL METHODOLOGY IN THE
ENVIRONMENTAL FIELD.
Pollensa. Mallorca. Hiszpania, 02-05/10/2007
10. M.E. Ortiz-Santaliestra, E. Sanz Rodríguez, M. Bryszewska, R. Muñoz Olivas, C. Cámara
Arsenic accumulation and biotransformation during *Rana perezi* aquatic development.
14TH EUROPEAN CONGRESS OF HERPETOLOGY.
Porto. Portugalia. 19-23/09/2007

Dalsze prace, plany badawcze i naukowe

Moje plany badawcze obejmują kontynuację badań prowadzonych w ostatnim okresie oraz rozszerzenie obszarów badawczych o zagadnienia związane z nanocząstkami i bezpieczeństwem ich stosowania.

Doświadczenie i wiedzę dotyczącą konstruowania produktów żywnościowych, innowacyjnych pod względem składu i wartości odżywczej, którą nabyłam w trakcie realizacji projektu Bake4Fun, wykorzystam w badaniach o charakterze wdrożeniowym. W efekcie nawiązanej z Nowel sp. z o.o. współpracy powstał projekt badawczy, który został zakwalifikowany do finansowania. Z uzyskanych 2017 środków w przedsiębiorstwie powstaje Centrum Badawczo Rozwojowe. W następnych latach, w ramach Wieloletniej Umowy Ramowej o Współpracy Partnerskiej, w kooperacji z Politechniką Łódzka, będą w nim prowadzone prace B+R, których celem będzie opracowanie gamy pieczywa prozdrowotnego w tym pieczywa pszennego o zwiększonej zawartości żelaza, błonnika oraz z dodatkiem nasion i ziaren „superfoods”.

W moich planach naukowych na najbliższe lata zawieram również rozszerzenie zainteresowań badawczych i włączenie się w prace badawcze rozpatrujące różne aspekty zastosowania nanocząstek. Nanotechnologia jest nauką, która obecnie rozwija się bardzo intensywnie i znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach życia (np. przemysł spożywczy, kosmetyki, medycyna i farmacja). Równolegle rośnie niepewność związana z zagrożeniem dla środowiska i życia ludzi powodowanego przez zanieczyszczenie środowiska naturalnego i żywności, dlatego też bardzo ważne jest zwiększenie znaczenia i odpowiedzialność badań i innowacji w dziedzinie bezpieczeństwa wykorzystania nanomateriałów w biotechnologii. Projekt dotyczący tych zagadnień zatytułowany: Territorial multi-actor clusters for responsible research in nano-biotechnology safety /TERRINANOBIO/, złożyliśmy w programie SwafS-14-2018-2019 Supporting the development of territorial Responsible Research and Innovation. Call: H2020-SwafS-2018-2020 Science with and for Society.

Cytowana literatura

1. Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.-G.; Muntau, H.; van Leeuwen, H. P.; Lobinski, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1453–1470.
2. Benito, P.; Miller, D. Iron absorption and bioavailability: An updated review. *Nutr. Res.* **1998**, 18, 581–603.
3. Peijnenburg, W. J. G. M.; Jager, T. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2003**, 56, 63–77.
4. Fairweather-Tait, S.; Lynch, S.; Hotz, C.; Hurrell, R.; Abrahamse, L.; Beebe, S.; Bering, S.; Bukhave, K.; Glahn, R.; Hambidge, M.; Hunt, J.; Lonnerdal, B.; Miller, D.; Mohktar, N.; Nestel, P.; Reddy, M.; Sandberg, A.-S.; Sharp, P.; Teucher, B.; Trinidad, P. T. The Usefulness of in vitro Models to Predict the Bioavailability of Iron and Zinc: A Consensus Statement From the HarvestPlus Expert Consultation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2005**, 75, 371–374.
5. PINTO, M.; Robineleon, S.; Appay, M. D.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; LACROIX, B.; Simonassmann, P.; Haffen, K.; FOGH, J.; Pinto, M.; Robine, S.; Appay, M.-D.; Lacroix, B.; Assmann, P. F.; Fogh, J.; Appay, M.; Assman, P. F.; Fogh, J.; Zweibaum, A.; Pinto, L.; Appay, M.; Zwwibaum, A.; Robin, S.; Simon, P.; Robinelocon, S. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human-colon carcinoma cell-line Caco-2 in culture 1983.
6. Straif, K.; Benbrahim-Tallaa, L.; Baan, R.; Grosse, Y.; Secretan, B.; El Ghissassi, F.; Bouvard, V.; Guha, N.; Freeman, C.; Galichet, L.; Coglian, V. A review of human carcinogens — Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol.* **2009**, 10, 453–454.
7. Ravenscroft, P.; Brammer, H.; Richards, K. S. *Arsenic pollution : a global synthesis*; Wiley-Blackwell, 2009.
8. Bhattacharjee, P.; Banerjee, M.; Giri, A. K. Role of genomic instability in arsenic-induced

- carcinogenicity. A review. *Environ. Int.* **2013**, 53, 29–40.
9. Cullen, W. R. Chemical Mechanism of Arsenic Biomethylation. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, 27, 457–461.
10. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA J.* **2014**, 12, 3846.
11. Kryukov, G. V.; Castellano, S.; Novoselov, S. V.; Lobanov, A. V.; Zehtab, O.; Guigó, R.; Gladyshev, V. N. Characterization of Mammalian Selenoproteomes. *Science (80-)*. **2003**, 300, 1439–1443.
12. Rayman, M. P. The importance of selenium to human health. *Lancet* **2000**, 356, 233–241.
13. Thiry, C.; Ruttens, A.; De Temmerman, L.; Schneider, Y.-J.; Pussemier, L. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chem.* **2012**, 130, 767–784.
14. Ogra, Y.; Ishiwata, K.; Iwashita, Y.; A, K. S.-J. of C.; 2005, undefined Simultaneous speciation of selenium and sulfur species in selenized odorless garlic (*Allium sativum* L. Shiro) and shallot (*Allium ascalonicum*) by HPLC. *Elsevier*.
15. Cappon, C. J.; Smith, J. C. Mercury and selenium content and chemical form in fish muscle. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1981**, 10, 305–319.
16. Reyes, L.; Mar, J.; Rahman, G.; Talanta, B. S.-; 2009, undefined Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography. *Elsevier*.
17. Castillo-Duran, C.; Ruz, M. Epidemiology of Micronutrient Deficiencies in Developing and Developed Countries, Specifically Zinc, Copper, Selenium and Iodine.
18. Fontagné-Dicharry, S.; Godin, S.; Liu, H.; Antony Jesu Prabhu, P.; Bouyssi re, B.; Bueno, M.; Tacon, P.; M dale, F.; Kaushik, S. J. Influence of the forms and levels of dietary selenium on antioxidant status and oxidative stress-related parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Br. J. Nutr.* **2015**, 113, 1876–1887.
19. Ilham, I.; Siddik, M. A. B.; Fotedar, R. Effects of Organic Selenium Supplementation on Growth, Accumulation, Haematology and Histopathology of Juvenile Barramundi (*Lates calcarifer*) Fed High Soybean Meal Diets. *Biol. Trace Elem. Res.* **2016**, 174, 436–447.
20. Fox, T.; Heuvel, E. Van den; ... C. A.-E. journal of; 2004, undefined Bioavailability of selenium from fish, yeast and selenate: a comparative study in humans using stable isotopes. *nature.com*.
21. Rider, S. A.; Davies, S. J.; Jha, A. N.; Clough, R.; Sweetman, J. W. Bioavailability of co-supplemented organic and inorganic zinc and selenium sources in a white fishmeal-based rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diet. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. **2010**, 94, 99–110.
22. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG); Brown, K. H.; Rivera, J. A.; Bhutta, Z.; Gibson, R. S.; King, J. C.; L nnerdal, B.; Ruel, M. T.; Sandtr m, B.; Wasantwisut, E.; Hotz, C. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr. Bull.* **2004**, 25, S99–203.
23. Ganz, T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol. Rev.* **2013**, 93, 1721–1741.
24. Gunshin, H.; Mackenzie, B.; Berger, U. V.; Gunshin, Y.; Romero, M. F.; Boron, W. F.;

- Nussberger, S.; Gollan, J. L.; Hediger, M. A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **1997**, 388, 482–488.
25. McKie, A. T.; Barrow, D.; Latunde-Dada, G. O.; Rolfs, A.; Sager, G.; Mudaly, E.; Mudaly, M.; Richardson, C.; Barlow, D.; Bomford, A.; Peters, T. J.; Raja, K. B.; Shirali, S.; Hediger, M. A.; Farzaneh, F.; Simpson, R. J. An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron. *Science* (80-.). **2001**, 291, 1755–1759.
26. De Domenico, I.; Ward, D. M.; Kaplan, J. Hepcidin regulation: ironing out the details. *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 1755–1758.
27. Nemeth, E.; Tuttle, M. S.; Powelson, J.; Vaughn, M. B.; Donovan, A.; Ward, D. M.; Ganz, T.; Kaplan, J. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science* (80-.). **2004**, 306, 2090–2093.
28. Thomas, C.; Oates, P. S. Ferroportin/IREG-1/MTP-1/SLC40A1 modulates the uptake of iron at the apical membrane of enterocytes. *Gut* **2004**, 53, 44–9.
29. Donovan, A.; Lima, C. A.; Pinkus, J. L.; Pinkus, G. S.; Zon, L. I.; Robine, S.; Andrews, N. C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* **2005**, 1, 191–200.
30. Hurrell, R.; Egli, I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, 91, 1461S–1467S.
31. Navas-Carretero, S.; Pérez-Granados, A. M.; Sarriá, B.; Vaquero, M. P. Iron absorption from meat pate fortified with ferric pyrophosphate in iron-deficient women. *Nutrition* **2009**, 25, 20–24.
32. Uauy, R.; Hertrampf, E.; Reddy, M. Iron fortification of foods: overcoming technical and practical barriers. *J. Nutr.* **2002**, 132, 849S–52S.
33. Kumar, A.; Lal, M. K.; Kar, S. S.; Nayak, L.; Ngangkham, U.; Samantaray, S.; Sharma, S. G. Bioavailability of iron and zinc as affected by phytic acid content in rice grain. *J. Food Biochem.* **2017**, 41, e12413.
34. Rivera, D.; Gallego, E.; MariPaz, V.; Andrea Gianotti Innovative iron fortified bakery products.
35. Hurrell, R. F.; Reddy, M. B.; Juillerat, M.-A.; Cook, J. D. Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, 77, 1213–9.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH

Moje pozostałe zainteresowania naukowo-badawcze związane były z dwoma obszarami tematycznymi:

- Żywność wzbogacana w selen.
- Immunoreaktywność mąki pszennej.

Za działalność naukową otrzymałam Nagrodę Rektora PŁ w 2008, 2010, 2011 oraz 2012.

Ad. ŻYWNOSĆ WZBOGACANA W SELEN

Bezpośrednio po ukończeniu studiów uzyskałam zatrudnienie w Instytucie Podstaw Chemii Żywności PŁ i rozpoczęłam prace badawcze w zespole dr. hab. W. Ambroziaka, który następnie był promotorem w moim przewodzie doktorskim. Poszukując tematu badawczego zajmowałam się m.in. oceną aktywności dehydrogenazy aldehydowej w tkankach ssaków, oddziaływaniami fotoaktywatorów z kwasami nukleinowymi i materiałem tkankowym. Następny obszar badawczy, w którym pracowałam związany był z pozyskiwaniem dodatków do żywności, które byłyby źródłem związków selenoorganicznych. W badaniach tych kielki roślin były rozpatrywane jako ich biologiczne źródło Se. Wyniki naszych badań oraz zespołu zajmującego się otrzymaniem biomasy drobnoustrojów wzbogaconych w selen stały się podstawą do uzyskania grantu: UE ERB-IC15-CT98-0903 Inco-Copernicus „Improved methods for producing Polish and Ukrainian fermented food”, w którym byłam wykonawcą. W późniejszym czasie uzyskałam grant promotorski KBN 6 PO6 G05720: Biomasa roślinna jako źródło suplementacji selenu w diecie. Składałam również wnioski grantowe, w których planowany był zakup HPLC-ICP-MS, dostępność tej aparatury umożliwiłaby mi prowadzenie badań specjacyjnych w macierzystej jednostce, jednakże żaden z nich nie uzyskał finansowania.

Prace badawcze przeprowadzone w ramach projektów i ich rezultaty stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej oraz artykułów, zestawionych poniżej.

Publikacje te przedstawiają wyniki badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej, ale opublikowane zostały po doktoracie.

1. O. Stabnikova, V. Ivanov, I. Larionova, V. Stabnikov, **M.A. Bryszewska**, J. Lewis.
Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast.
LWT - FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. 2008, 41(5), 890 – 895.
IF 1,887 IF 5-letni 2,260 MNiSzW 20
2. **M.A. Bryszewska**, W. Ambroziak, N.J. Langford, M.J. Baxter, A. Colyer, D. J. Lewis.
The effect of consumption of selenium enriched rye/wheat sourdough bread on the body's selenium status.
PLANT FOODS FOR HUMAN NUTRITION. 2007, 62, 121-126.
IF 0,885 IF 5-letni 1,144 MNiSzW 15
3. **M. Bryszewska**, W. Ambroziak, J. Rudzinski J. Lewis.
Characterisation of selenium compounds in rye seedling biomass using ⁷⁵Se-labelling/SDS-

PAGE separation/gama scintillation counting, and HPLC-ICP-MS analysis of a range of enzymatic digests.

ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY. 2005, 382(5), 1279-1287.

IF 2,695 IF 5-letni - MNiSzW 20

4. **M. Bryszewska**, W. Ambroziak, A. Diowks, N. Langford, M. Baxter, J. Lewis.

Changes in the chemical form of selenium observed during the manufacture of a selenium-enriched sourdough bread for use in a human nutrition study.

FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS. 2005, 22(2), 135-140.

IF 1,610 IF 5-letni - MNiSzW 24

5. Diowks, **M. Bryszewska**, W. Ambroziak.

Selenium bread – a solution to the deficiency problem?

POLISH JOURNAL OF HUMAN NUTRITION AND METABOLISM. 2004, Suppl., 99-106.

IF — IF 5-letni — MNiSzW 3

Rozdziały w monografii

Selen: pierwiastek ważny dla zdrowia, fascynujący dla badacza. Praca zbiorowa pod redakcją M. Wierzbicka, E. Bulska, K. Pyrzyńska, I. Wysocka, B. A. Zachara. Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa, 2007

1. A. Diowks, **M.A. Bryszewska**, W. Ambroziak, J. Lewis

Wzbogacona w selen biomasa drobnoustrojów, roślin oraz żywność fermentowana. str. 218-234.

MNiSzW 3

2. W. Ambroziak, A. Diowks, **M. Bryszewska**.

Metody suplementacji diety w selen. str. 206-217.

MNiSzW 3

Przykłady wykorzystania kiełków roślin, jako źródła selenu, spotkałam również w późniejszej w literaturze naukowej. Ciekawym przykładem może być rozprawa doktorska mgr inż. Małgorzaty Bodnar: „Sprawdzenie możliwości wytworzenia kandydata na materiał odniesienia na potrzeby specjacji selenu w oparciu o wzbogacone w selen kiełki roślin”, zrealizowana w 2016 na Politechnice Gdańskiej.

Ad. IMMUNOREAKTYWNOŚĆ MĄKI PSZENNEJ

W 2003 w macierzystym instytucie PŁ wyodrębniony był zespół badawczy, zajmujący się modyfikacjami mąki pszennej mającymi na celu obniżenia jej alergenicności, do którego dołączyłam po zakończeniu prac badawczych zamkniętych doktoratem. Zespół dr Joanny Leszczyńskiej badał efektywność różnych sposobów fizycznego, chemicznego i enzymatycznego modyfikowania mąki pszennej w obniżeniu immunoreaktywności białek tych mąk. Sprawdzana była przydatność różnych sposobów redukcji immunoreaktywności jak: promieniowanie jonizujące i mikrofalowe, modyfikacja subtylizyną, sieciowanie enzymatyczne i chemiczne, reakcje plasteinizacji oraz fermentację mlekową. Do wykrywania i oznaczania białek potencjalnie

wywołujących nietolerancje pokarmowe stosowana była metoda immunometryczna ELISA, wykorzystująca mono- i poliklonalne przeciwciała. Rozbudowaniem warsztatu analitycznego miało być zastosowanie technik elektroforetycznych umożliwiających analizę profili białkowych mąk poddawanych modyfikacjom. W zespole zajęłam się doбором warunków rozdziału białek pszennych metodą elektro-ogniskowania i elektroforezy dwukierunkowej z wykorzystaniem żeli kapilarnych oraz paskowych.

W ramach poszukiwania możliwości rozszerzenia obszarów zastosowania immunoanalizy w 2012 przygotowałam wniosek o finansowanie projektu badawczego własnego: "Opracowanie immunoenzymatycznych metod oznaczania jonów metali w próbkach środowiskowych" zgłoszony w 36 konkursie Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (wniosek nr 41641). Celem proponowanych badań była weryfikacja założenia o możliwości zastosowania przeciwciał poliklonalnych w testach immunoenzymatycznych do oznaczania zawartości jonów metali ciężkich takich jak: rtęć, kadm i nikiel. Współpracę przerwał mój wyjazd na stypendium badawcze w 2010 roku. W wyniku przeprowadzonych wówczas prac powstały wymienione poniżej publikacje, oraz doniesienia konferencyjne.

1. J. Leszczyńska, A. Diowks, A. Łacka, M. Bryszewska, K. Wolska, W. Ambroziak.
Decrease of wheat flour allergenicity via lactic acid fermentation.
FOOD AND AGRICULTURAL IMMUNOLOGY, 2009, 2(2), 139-145
IF 0,612 IF 5-letni 0,565 MNiSzW 15
2. J. Leszczyńska, A. Łacka, M. Bryszewska, E. Brzezińska-Błaszczuk.
The usefulness of rabbit anti-QQQPP peptide antibodies to wheat flour antigenicity studies.
CZECH JOURNAL OF FOOD SCIENCES. 2008, 26 (1), 24-30
IF 0,472 IF 5-letni — MNiSzW —
3. J. Leszczyńska, M. Bryszewska, A. Łacka, K. Wolska, H. Żegota.
The immunoreactivity reduction of wheat flour modified by the treatment with subtilisin.
POLISH JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION SCIENCES. 2008, 58(3), 335-340
IF 0,602 IF 5-letni — MNiSzW 6
4. J. Leszczyńska, A. Łacka, M. Bryszewska.
The use of transglutaminase in the reduction of immunoreactivity of wheat flour.
FOOD AND AGRICULTURAL IMMUNOLOGY. 2006, 17(2), 105 – 113
IF 0,667 IF 5-letni — MNiSzW 15