

Rada Naukowa Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. M. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

za pośrednictwem:

Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Krystyna Makowska
Katedra Diagnostyki Klinicznej,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wniosek

z dnia 3.04.2023

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora **habilitowanego w dziedzinie Nauk Weterynaryjnych** w dyscyplinie **Weterynaria**.

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

„Bisfenol A i jego analog bisfenol S jako czynniki wpływające na neurochemiczną charakterystykę neuronów jelitowego układu nerwowego zlokalizowanego na terenie żołądka i okrężnicy wybranych gatunków ssaków”

Wnioskuje – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym**^{*1}

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

Krystyna Makowska

(podpis wnioskodawcy)

¹ * Niepotrzebne skreślić.

Załączniki:

1. Dane wnioskodawcy
2. Kopia Dyplomu Doktorskiego
3. Autoreferat
4. Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny
5. Deklaracje współautorów wskazujące na ich wkład w cykl powiązanych tematycznie artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego
6. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego
7. Kopie dokumentów potwierdzających kierownictwo lub udział w grantach
8. Kopie dokumentów potwierdzających staże w zagranicznych jednostkach naukowych
9. Kopie dokumentów potwierdzających współpracę naukową
10. Kopie dokumentów potwierdzających otrzymanie nagród naukowych

Osiągnięcie habilitacyjne pt.

***Bisfenol A i jego analog bisfenol S jako
czynniki wpływające na neurochemiczną
charakterystykę neuronów jelitowego
układu nerwowego zlokalizowanego na
terenie żołądka i okrężnicy wybranych
gatunków ssaków***

oraz pozostały dorobek naukowy

Krystyna Makowska

Katedra Diagnostyki Klinicznej

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 2023

Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Autoreferat

Dr wet. Krystyna Makowska

**Katedra Diagnostyki Klinicznej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie**

Olsztyn 2023

1. Imię i nazwisko.

Krystyna Makowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

JEDNOLITE STUDIA MAGISTERSKIE:

Miejsce studiów: Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Rok ukończenia: 2015

Tytuł: lekarz weterynarii

STUDIA DOKTORANCKIE:

Miejsce studiów: Katedra Fizjologii Klinicznej,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Obrona pracy doktorskiej: 2020

Stopień naukowy: doktor nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria

Tytuł rozprawy doktorskiej: Wpływ wybranych czynników fizjologicznych i patologicznych na liczebność i neurochemiczną charakterystykę neuronów immunoreaktywnych wobec peptydu kodowanego genem kalcytoniny (CGRP) na terenie jelitowego układu nerwowego okrężnicy zstępującej świni domowej

Promotor: prof. dr hab. Sławomir Gonkowski

STUDIA PODYPLOMOWE:

Miejsce studiów: Katedra Diagnostyki Klinicznej,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Tytuł: specjalista chorób psów i kotów

Rok ukończenia: 2021

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- | | | |
|------------------------|---|---|
| 1.10.2015 – 31.06.2019 | – | doktorant, Katedra Fizjologii Klinicznej,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie |
| 1.07.2019 – 28.02.2020 | – | asystent, Katedra Diagnostyki Klinicznej,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie |
| od 1.03.2020 | – | adiunkt, Katedra Diagnostyki Klinicznej,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie |

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4.1 Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

Bisfenol A i jego analog bisfenol S jako czynniki wpływające na neurochemiczną charakterystykę neuronów jelitowego układu nerwowego zlokalizowanego na terenie żołądka i okrężnicy wybranych gatunków ssaków

Cykl ten obejmuje 5 oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w latach 2020 – 2023 w czasopismach indeksowanych, na dzień ukazania się publikacji*, w bazie Journal Citation Reports (JCR)

Wartość ważniejszych parametrów bibliometrycznych zgłaszanego osiągnięcia:

- ❖ łączna liczba punktów MEiN (według wykazu listy czasopism punktowanych MEiN z dn. 9 lutego 2021 r.) to **660 pkt**,
- ❖ łączny współczynnik oddziaływania [Impact factor (IF)] na dzień składania wniosku to **14,455** (a na dzień publikacji prac, wg listy wskaźników wpływu z 2021 roku to 23,683*).

**Decyzją Claritive Analytics z dnia 15 marca 2023 czasopismo International Journal of Environmental Research and Public Health przestało być indeksowane w bazie Web of Science, a tym samym w bazie JCR.*

4.2 Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu:

1. **Makowska K.**, Gonkowski S. “*Bisfenol A (BPA) affects the enteric nervous system in the porcine stomach*” *Animals*, 2020, 10(12):2445. doi: 10.3390/ani10122445.
IF₂₀₂₀: **2,752**, Punktacja MNiSW₂₀₂₀: **100**
2. **Makowska K.**, Gonkowski S. “*Changes in the enteric neurons containing selected active substances in the porcine descending colon after the administration of bisphenol A (BPA)*” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19: 16187. doi: 10.3390/ijerph192316187.
Punktacja MEiN₂₀₂₂: **140** (obecnie czasopismo nie posiada IF; na dzień publikacji wynosił on **4,614****)
3. **Makowska K.**, Lepiarczyk E., Gonkowski S. „*The comparison of the influence of bisphenol A (BPA) and its analogue bisphenol S (BPS) on the enteric nervous system of the distal colon in mice*” *Nutrients*, 2023, 15: 200. doi: 10.3390/nu15010200.
IF₂₀₂₃: **6,706**, Punktacja MEiN₂₀₂₃: **140**
4. **Makowska K.**, Calka J., Gonkowski S. “*Effects of the long-term influence of bisphenol A and bisphenol S on the population of nitrergic neurons in the enteric nervous system of the mouse stomach*”, *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 331. doi: 10.1038/s41598-023-27511-9.
IF₂₀₂₃: **4,997**, Punktacja MEiN₂₀₂₃: **140**
5. **Makowska K.**, Gonkowski S. “*Changes caused by bisphenols in the chemical coding of neurons of the enteric nervous system of mouse stomach*” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2023, 20: 5125. <https://doi.org/10.3390/ijerph20065125>
Punktacja MEiN₂₀₂₂: **140** (obecnie czasopismo nie posiada IF; na dzień publikacji wynosił on **4,614****)

**** Wyjaśnienie dotyczące współczynnika wpływu publikacji oznaczonych numerami 2 i 5**
W marcu 2023 czasopismo *International Journal of Environmental Research and Public Health* wydawnictwa MDPI przestało być indeksowane przez bazę Web Of Science (WOS). Decyzja ta została uzasadniona tym, że czasopismo przestało spełniać kryteria indeksacji czasopism w WOS (content relevance criterion). Zarzuty te nie odnosiły się do jakości merytorycznej publikacji, ale do tego, że publikowane były prace o tematyce spoza zakresu tego czasopisma. W dniu ukazania się artykułu z pozycji nr 5, czasopismo posiadało impact

factor = 4,614. Dopiero po opublikowaniu wyżej wymienionej pracy otrzymałam wiadomość mailową od Redaktora Naczelnego tego czasopisma informującą o zaistniałej sytuacji oraz o złożeniu odwołania od tej decyzji. Odwołanie jest obecnie rozpatrywane przez Claritive. Niestety, w związku z powyższym, istnieje duże prawdopodobieństwo, że International Journal of Environmental Research and Public Health nie zostanie umieszczone na nowej liście wskaźników wpływu (Impact Factor) za lata 2022/2023. Należy również zaznaczyć, że czasopismo International Journal of Environmental Research and Public Health nadal znajduje się w innych bazach indeksujących takich jak Scopus czy Google Scholar.

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że:

- ❖ We wszystkich publikacjach wchodzących w skład zgłaszanego osiągnięcia mój udział był wiodący.
- ❖ W badaniach naukowych, których wyniki opisane zostały w publikacjach oznaczonych numerami 1 i 2 mój wkład polegał na współudziale w stworzeniu koncepcji pracy, współudziale w opracowaniu metodyki badań, współudziale w przeprowadzeniu zabiegów na zwierzętach i uzyskaniu materiału do badań, przeprowadzeniu barwień immunohistochemicznych, interpretacji i opracowaniu wyników badań, przeglądzie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu, wykonaniu rycin, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje, wprowadzeniu korekt w ostatecznej wersji manuskryptu, korespondencji z edytorem i recenzentami, uzyskaniu finansowania na publikację wyników z programu Ministra Edukacji i Nauki pt. „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” (Nr 010/RID/2018/2019). W związku z powyższym swój procentowy udział w pracach oznaczonych numerami 1 i 2 oceniam na 70%.
- ❖ W badaniach naukowych, których wyniki opisane zostały w publikacjach oznaczonych numerami 3, 4 i 5 mój wkład w powstanie pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, uzyskaniu pozwoleń niezbędnych do przeprowadzenia doświadczeń, uzyskaniu finansowania z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM (Nr UMO-2018/31/N/NZ7/01252), opracowaniu metodyki badań, współudziale w przeprowadzeniu zabiegów na zwierzętach i uzyskaniu materiału do badań, przeprowadzeniu barwień immunohistochemicznych, interpretacji i opracowaniu wyników badań, przeglądzie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu, wykonaniu rycin, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje, wprowadzeniu korekt w ostatecznej wersji manuskryptu, korespondencji z edytorem i recenzentami, uzyskaniu finansowania na publikację wyników z programu Ministra Edukacji i Nauki pt. „Regionalna Inicjatywa

Doskonałości” (Nr 010/RID/2018/2019). W związku z powyższym swój procentowy udział w pracy oznaczonej numerem 3 oceniam na 85% oraz w pracach oznaczonych numerami 4 i 5 na 90%.

4.3. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników:

4.3.1 Wprowadzenie

W obecnych czasach zanieczyszczenie środowiska naturalnego substancjami używanymi w różnych gałęziach przemysłu oraz wpływ tego zanieczyszczenia na zdrowie ludzi i zwierząt staje się coraz większym globalnym problemem współczesnej medycyny, weterynarii i toksykologii. Wśród wielu substancji przenikających do środowiska na skutek działalności człowieka na szczególną uwagę zasługują bisfenole.

Bisfenole to związki organiczne z grupy fenoli szeroko stosowane w przemyśle tworzyw sztucznych do produkcji polimerów i żywic epoksydowych. Powszechnie występują one w wielu przedmiotach codziennego użytku, klejach, farbach, rurach wodociągowych, kosmetykach, a także na powierzchni papieru termicznego (Suzuki i in. 2000; Vandenberg i in. 2007). Produkty zawierające w swoim składzie bisfenole charakteryzują się znaczną wytrzymałością i odpornością na uszkodzenia, a jednocześnie są lekkie i wygodne w użyciu (Vandenberg i in. 2007).

Głównym przedstawicielem grupy bisfenoli stosowanym od wielu dziesięcioleci w przemyśle tworzyw sztucznych jest bisfenol A (BPA) (Michałowicz i in. 2014). Jednakże liczne badania naukowe wykazały, że związek ten, który pod względem budowy chemicznej wykazuje podobieństwo do estrogenu, ma wielokierunkowy negatywny wpływ na organizmy ludzkie i zwierzęce (Bloom i in. 2016), przenikając do ich wnętrza przez układ pokarmowy, płuca i skórę (Vandenberg i in. 2007). Dotychczas udowodniono szkodliwe działanie BPA między innymi na układ hormonalny, rozrodczy, pokarmowy, nerwowy, immunologiczny oraz krążenia (Michałowicz i in. 2014; Konieczna i in. 2015; Almeida i in. 2018). Ponadto wiadomo, iż ten związek przyczynia się do występowania zaburzeń przemiany materii, rozwoju nowotworów, a nawet zmian neurodegeneracyjnych w mózgu (Gao i Wang 2014; Wang i in. 2019; Rubin 2011).

W związku z powyższym, przepisy wielu państw świata coraz częściej wprowadzają liczne ograniczenia w produkcji i zastosowaniu BPA (Charitos i in. 2022; Frankowski i in. 2020). Ograniczenia te polegają przede wszystkim na eliminacji BPA z produkcji przedmiotów przeznaczonych dla przyszłych matek i noworodków, zabawek oraz pojemników na żywność i wprowadzaniu produktów „wolnych od bisfenolu A” (ang. „BPA free”). Ponadto ustalono

dawki BPA, które powinny być bezpieczne dla ludzi. I tak Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) początkowo ustalił tolerowaną dzienną dawkę (ang. tolerable daily intake – TDI) BPA na poziomie 0,05 mg/kg masy ciała (m.c.) (EFSA 2006). Jednakże, ze względu na to, że przy takiej dawce odnotowano pewne zmiany w układzie odpornościowym (Rogers i in. 2013) w 2015 r. TDI dla tej substancji została obniżona do 4 µg/kg m.c./dzień (Grob i in. 2015), a obecnie pojawiają się propozycje dotyczące dalszego obniżania TDI. Niemniej jednak należy podkreślić, iż w ustawodawstwach niektórych krajów pozaeuropejskich dawka BPA na poziomie 0,05 mg/kg m.c./dobę jest nadal wymieniana jako TDI lub dawka referencyjna (Almeida i in. 2018).

Ograniczenia w użyciu BPA spowodowały konieczność zastąpienia tego związku innymi substancjami o podobnych właściwościach. Najczęściej stosowanym zamiennikiem BPA jest bisfenol S (BPS), który znajduje szerokie zastosowanie zwłaszcza w wyrobach przeznaczonych dla dzieci i przedmiotach mających kontakt z żywnością (Aloisi i in. 2002; Braniste i in. 2010; Caporossi i Papaleo, 2017). Do niedawna BPS był uważany za całkowicie bezpieczny dla organizmów żywych. Jednak najnowsze badania wykazały, że ta substancja, podobnie jak BPA, stymuluje receptory estrogenowe i może mieć negatywny wpływ na szereg procesów fizjologicznych (Gramec Skledar i Peterlin Mašič, 2016; Usman i Ahmad, 2016; Rosenfeld, 2017). Stwierdzono między innymi, że BPS działa cyto-, geno- i neurotoksycznie oraz upośledza funkcje układu immunologicznego (Qiu i in. 2020), a niektóre badania wykazały, że BPS zaburza gospodarkę hormonalną nawet silniej niż BPA (Thoene i in. 2020).

Pomimo znacznego rozwoju wiedzy na temat szkodliwego działania bisfenoli, wiele aspektów związanych z ich wpływem na organizmy żywe wciąż pozostaje nie w pełni wyjaśnionych. Jednym z nich jest wpływ bisfenoli na jelitowy układ nerwowy (ang. enteric nervous system - ENS) na terenie żołądka i okrężnicy. Zagadnienie to ma kluczowe znaczenie w poznaniu oddziaływania bisfenoli na organizmy żywe, gdyż główną drogą wnikania tych związków jest przewód pokarmowy. Wiadomo, iż BPA może działać hamująco na motorykę przewodu pokarmowego i upośledzać wydzielanie mucyny w błonie śluzowej jelit (Sarkar i in. 2016). Z jednoczesnym nasileniem apoptozy i zmniejszeniem stopnia proliferacji enterocytów (Qu i in. 2018), prowadzi to do upośledzenia bariery jelitowej i zwiększenia przepuszczalności jelit (Braniste i in. 2010; Feng i in. 2019), a wiadomo, że ENS jest ważnym czynnikiem regulującym tę przepuszczalność (Liu i in. 2019).

Należy podkreślić, że struktura jelitowego układu nerwowego różni się w zależności od gatunku i odcinka przewodu pokarmowego. W przypadku gryzoni na terenie całego przewodu pokarmowego występują dwa rodzaje śródściennych zwojów nerwowych: podśluzowe (ang.

submucous ganglia - SG) zlokalizowane w warstwie podśluzowej ściany przewodu pokarmowego oraz mięśniowe (ang. myenteric ganglia - MG) znajdujące się pomiędzy warstwą mięśni podłużnych i okrężnych błony mięśniowej (Parathan i in. 2020). Budowa ENS na terenie żołądka u dużych ssaków (np. u świni domowej) jest analogiczna jak u gryzoni (Furness i in. 2014). Jednak na terenie jelit, zwoje podśluzowe uległy podziałowi na zwoje podśluzowe zewnętrzne (ang. outer submucous ganglia - OSG) znajdujące się w pobliżu wewnętrznej strony warstwy mięśniowej oraz zwoje podśluzowe wewnętrzne (ang. inner submucous ganglia - ISG) położone bliżej światła jelita i błony śluzowej (Furness 2012).

Neurony ENS charakteryzują się znacznym zróżnicowaniem pod względem neurochemicznym (Furness i in. 2014; Kaleczyc i in. 2007; Wojtkiewicz i in. 2012; Makowska i in. 2017). Do tej pory w neuronach zlokalizowanych w ścianie przewodu pokarmowego opisano kilkadziesiąt substancji aktywnych. Do najważniejszych z nich należą acetylocholina, substancja P (SP), naczynioaktywny polipeptyd jelitowy (VIP), galanina (GAL) i tlenek azotu.

Wymienione substancje pełnią na terenie jelit różnorodne funkcje. Acetylocholina jest głównym neuroprzekaźnikiem o charakterze pobudzającym na terenie przewodu pokarmowego a także wykazuje właściwości przeciwzapalne (The i in. 2011). Poza tym acetylocholina razem z SP, która odgrywa ważną rolę w przewodzeniu bodźców czuciowych (Norton i in. 2021), znane są jako substancje zwiększające kurczliwość mięśni ściany jelita i wpływające na wydzielanie żołądkowo-jelitowe (Nezami i in. 2010; Velarde i in. 2009; Lu i in. 2016). Z kolei tlenek azotu i VIP są jednymi z najważniejszych czynników hamujących kurczliwość mięśni gładkich i powodujących rozkurcz ściany jelita (Van Geldre i in. 2004). Ponadto obie te substancje powodują rozszerzenie naczyń krwionośnych (Bohlen 2011; Currò i Preziosi 1998). GAL bierze również udział w regulacji motoryki i aktywności wydzielniczej jelit, a jej rola zależy od gatunku zwierzęcia i odcinka przewodu pokarmowego (Brzozowska i Całka 2021). Ponadto większość z wyżej wymienionych neuroprzekaźników reguluje czynności układu odpornościowego (The i in. 2011; Koller i in. 2017; Brenneman i in. 2003).

Należy podkreślić, że ENS nie tylko reguluje pracę przewodu pokarmowego w stanie fizjologicznym, ale także aktywnie uczestniczy w mechanizmach (głównie o charakterze adaptacyjnym i protekcyjnym) powstających pod wpływem bodźców patologicznych i toksycznych, a podstawowym przejawem tego uczestnictwa jest zmienność neurochemicznego profilu neuronów (Giaroni i in. 1999; Vasina i in. 2006).

Bodźcami patologicznymi wpływającymi na ENS są schorzenia przewodu pokarmowego, choroby ogólnoustrojowe, zaburzenia metaboliczne, zakażenia pasożytnicze, stres, mechaniczne uszkodzenie przewodu pokarmowego lub nerwów zaopatrujących żołądek

i jelita, a także działanie toksyn i leków (Palmer i in. 1998; Vasina i in. 2006; Berezina i Ovsyannikov 2009; Gonkowski i in. 2009, 2010; Di Giancamillo i in. 2010; Makowska i in. 2017).

W świetle dotychczasowych badań wiadomo, że jednym z takich czynników, które wpływają na neurony jelitowe jest BPA. Jednakże należy podkreślić, że wiedza na ten temat jest fragmentaryczna i ogranicza się jedynie do jelita cienkiego świni domowej (Szymanska i in. 2018a,b). Do tej pory wpływ BPA na neurony ENS w ścianie żołądka i okrężnicy nie był w ogóle badany. Jeszcze mniej wiadomo o wpływie BPS na unerwienie jelit, ponieważ dotychczas nie przeprowadzono żadnych badań na ten temat w tym zakresie. Przeprowadzone badania są więc pierwszym opracowaniem dotyczącym wpływu BPA i BPS na ENS żołądka i okrężnicy oraz porównującym oddziaływanie obydwu bisfenoli na neurony jelitowe.

Powstaje pytanie, dlaczego ewentualne oddziaływanie bisfenoli na struktury nerwowe w żołądka i okrężnicy ma tak duże znaczenie. Otóż żołądek jest pierwszym odcinkiem przewodu pokarmowego, w którym pokarm jest trawiony przez dłuższy czas (około 2–4 h w zależności od rodzaju pokarmu) (Chaudhry i in. 2020). W tym czasie bisfenole (których metabolizm zachodzi dopiero w jelicie cienkim) zawarte w pożywieniu mogą oddziaływać bezpośrednio na ścianę żołądka. Ponadto wiadomo, że na ścianę żołądka mogą wpływać nie tylko bisfenole zawarte w pożywieniu, ale również te same związki, które zostają wchłonięte w jelicie cienkim i osiągają ścianę żołądka z krwią obwodową (Tanaka i in. 2010).

Okrężnica jest również w znacznym stopniu narażona na działanie bisfenoli. Jak wspomniano powyżej duża część bisfenoli jest metabolizowana w enterocytach jelita cienkiego lub wątrobie do glukuronianów i powtórnie wydzielana (bezpośrednio lub z żółcią) do światła przewodu pokarmowego (Inoue i in. 2003). Jednakże na terenie jelita ślepego glukuroniany bisfenoli pod wpływem flory bakteryjnej są z powrotem przekształcane do wolnych bisfenoli (Sakamoto i in. 2002). W związku z tym na ścianę okrężnicy oddziałują (podobnie jak ma to miejsce w żołądka) wolne bisfenole znajdujące się w treści pokarmowej oraz bisfenole docierające do ściany okrężnicy wraz z krwią obwodową, a także metabolity bisfenoli, które także mogą wpływać negatywnie na organizm żywy (Peillex i in. 2021). Ponadto na terenie okrężnicy rozwija się wiele procesów chorobowych takich jak wrzodziejące zapalenie okrężnicy, nowotwory czy choroba Hirschsprunga (Kosugi i in. 2002; Gonkowski i in. 2009; Rychlik i in. 2015; Kinugasa i in. 2016). Niektóre badania sugerują, że istnieje korelacja pomiędzy ryzykiem wystąpienia tego typu schorzeń, a stopniem ekspozycji na bisfenole (szczególnie BPA) (Javurek i in. 2016; Xu i in. 2016; DeLuca i in. 2018; Qu i in. 2018). Wyjaśnienie wpływu bisfenoli na ENS okrężnicy może więc być drogą do lepszego

zrozumienia procesów zachodzących w jelitowych strukturach nerwowych, które mogą prowadzić do wyżej wymienionych stanów patologicznych.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty cele niniejszych badań były następujące:

4.3.2 Cele badań:

- I. Określenie wpływu niskich i wysokich dawek bisfenolu A (BPA) na liczebność i dystrybucję neuronów immunoreaktywnych wobec wybranych substancji aktywnych takich jak: naczynioaktywny polipeptyd jelitowy (VIP), galanina (GAL), substancja P (SP) oraz pęcherzykowy transporter acetylocholino (VACHT – będący znacznikiem neuronów cholinergicznych) na terenie jelitowego układu nerwowego (ENS) żołądka i okrężnicy świni domowej.
- II. Porównanie wpływu niskich i wysokich dawek bisfenolu A i bisfenolu S (BPA i BPS) na ogólną liczbę neuronów na terenie poszczególnych typów zwojów jelitowego układu nerwowego (ENS) żołądka i okrężnicy myszy.
- III. Ustalenie liczebności i dystrybucji neuronów immunoreaktywnych wobec wybranych substancji neuroaktywnych (VIP, GAL, neuronalnej izoformie syntazy tlenu azotu nNOS – będącej znacznikiem neuronów nitrergicznych, SP oraz VACHT) na terenie poszczególnych typów zwojów ENS żołądka i okrężnicy myszy w warunkach fizjologicznych.
- IV. Porównanie wpływu różnych dawek BPA i BPS na liczebność neuronów VIP, GAL, nNOS, SP oraz VACHT – pozytywnych na terenie jelitowego układu nerwowego żołądka i okrężnicy myszy.

4.3.3 Metodyka badań:

W niniejszym badaniach wykonano 2 eksperymenty.

Eksperyment I

W badaniach wykorzystano 15 niedojrzałych płciowo, ośmiotygodniowych loszek rasy Pietrain x Duroc. Zwierzęta trzymane w kojcach (po pięć sztuk w każdej) odpowiednich dla ich wieku i gatunku w zwierzętarni Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Świnie były karmione dwa razy dziennie paszą komercyjną odpowiednią dla wieku i gatunku zwierząt i miały nieograniczony dostęp do wody pitnej. Wszystkie procedury podczas eksperymentu przeprowadzono na podstawie zgody wydanej przez Lokalną Komisję Etyki w Olsztynie (Polska) (decyzje nr 28/2013 z dnia 22 maja 2013 r. i 65/2013/DLZ z dnia 27 listopada 2013 r.).

Po kilkudniowym okresie adaptacyjnym zwierzęta podzielono na trzy grupy (po 5 sztuk w każdej): grupę kontrolną (SC) oraz dwie grupy doświadczalne. Wszystkie zwierzęta otrzymywały kapsułki żelatynowe codziennie, przed porannym karmieniem przez 28 dni. Kapsułki miały różną zawartość, w zależności od grupy zwierząt. Świnie w pierwszej grupie doświadczalnej (SBPA1) otrzymywały kapsułki wypełnione BPA (BISFENOL A, 99 +%, numer katalogowy: 239658-250G, Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) w dawce 0,05 mg/kg m.c./dzień, a świnie z drugiej grupy doświadczalnej (SBPA2) dostawały BPA w dawce 0,5 mg/kg m.c./dzień. Natomiast zwierzęta należące do grupy kontrolnej otrzymywały w ten sam sposób puste kapsułki żelatynowe.

Niższa dawka BPA użyta w doświadczeniu (0,05 mg/kg m.c./dzień) w przepisach niektórych państw dotyczących poziomu substancji szkodliwych w pożywieniu w jest wymieniana jako TDI lub dawka referencyjna dla BPA (EFSA 2006; Almeida i in. 2018).

Po upływie 28 dni zwierzęta zostały poddane premedykacji z użyciem leku Stresnil (Janssen, Beerse, Belgia, 75 µl/kg m.c., podany domięśniowo) a następnie po upływie około 30 min. poddane eutanazji poprzez przedawkowanie tiopentalu sodu (Thiopental, Sandoz, Kundl, Austria, podany do żyły brzeżnej ucha).

Od wszystkich zwierząt bezpośrednio po eutanazji pobrano fragmenty żołądka (w kształcie kwadratu o wymiarach około 3x3 cm z okolicy dna żołądka, 20 cm przed odźwiernikiem) oraz około 2 cm odcinki okrężnicy zstępującej. Tkanki zostały utrwalone w 4% zbuforowanym roztworze paraformaldehydu (pH 7,4) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (ang. room temperaturę - rt) a następnie płukane w buforze fosforanowym (w temperaturze 5°C) przez trzy dni z codzienną wymianą buforu. Po tym czasie fragmenty żołądka i okrężnicy umieszczono w 18% zbuforowanym roztworze sacharozy i przechowywano w temperaturze 5°C. Po co najmniej trzech tygodniach tkanki zamrożono w -20°C, pocięto z użyciem kriostatu (HM 525, Microm International, Dreieich, Niemcy) na skrawki o grubości 12 µm i umieszczono na szkiełkach mikroskopowych.

Eksperyment II

Doświadczenie przeprowadzono na 35 myszach szczepu CD1. Przez cały czas trwania doświadczenia zwierzęta utrzymywano w standardowych warunkach laboratoryjnych, które obejmują: stałą temperaturę 22±2°C, wilgotność 55±10%, cykl światło – ciemność 12:12, dostęp do wody i pokarmu *ad libitum*.

Wszystkie działania podczas eksperymentu zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie działającą przy Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie (Polska) – numer zgody 46/2019. Ponadto doświadczenie przeprowadzono zgodnie z ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt do celów naukowych lub dydaktycznych (Dz.U. 2015, nr 266), obowiązującą na terenie Rzeczypospolitej Polskiej. Podczas tego eksperymentu wszystkie metody zostały przeprowadzone zgodnie z odpowiednimi wytycznymi oraz przepisami europejskimi i polskimi. Ponadto badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments).

W wieku 3 miesięcy, gdy zwierzęta osiągnęły około 30 g masy ciała (m.c.), myszy losowo podzielono na 5 grup (po 7 zwierząt w każdej). Układ grup był następujący: 1) grupa kontrolna (grupa MC) – zwierzęta dostawały zwykłą wodę pitną; 2) grupa MBPA1 – zwierzęta otrzymywały BPA w dawce 5 mg/kg m.c./dobę; 3) grupa MBPA2 – myszy poddano ekspozycji na BPA w dawce 50 mg/kg m.c./dobę; 4) grupa MBPS1 – zwierzętom podawano BPS w dawce 5 mg/kg m.c./dobę; 5) Grupa MBPS2 – myszy otrzymywały BPS w dawce 50 mg/kg m.c./dobę.

Niższa dawka bisfenoli użyta w doświadczeniu (5 mg/kg m.c./dzień) odpowiada dawce NOAEL (ang. no-observed-adverse-effect level) czyli poziomowi niewywołującemu dających się zaobserwować szkodliwych skutków ustalonego dla BPA u myszy (Tyl i in. 2002; Choi i in. 2010; Zielinska i in. 2018). Natomiast wyższa dawka (50 mg/kg m.c./dzień) odpowiada dawce LOAEL (od ang. lowest observed adverse effect level) czyli najniższemu poziomowi obserwowanego działania szkodliwego przy podawaniu BPA myszom (Zielińska i in. 2018).

Bisfenole podawano w ten sam sposób we wszystkich grupach zwierząt. BPA i BPS rozpuszczano w wodzie do picia, a sposób podawania związków ustalano według metody opisaną wcześniej przez Dobrzyńską i in. (2018) oraz Rezg i in. (2018). W związku z tym, że bisfenole są nierozpuszczalne w wodzie, związki rozpuszczano w 20 µl alkoholu etylowego (70%), a następnie dodawano do wody pitnej. Do wody przeznaczonej dla zwierząt kontrolnych dodawano sam alkohol w takiej samej objętości jak w przypadku pozostałych grup zwierząt.

Bisfenole podawano przez okres trzech miesięcy. Następnie wszystkie myszy poddano eutanazji metodą dekapitacji i bezpośrednio po śmierci zwierząt pobrano fragmenty żołądków i okrężnic. Następnie narządy umieszczono w 4% zbuforowanym roztworze paraformaldehydu (pH 7,4) na 24 godziny. Przez kolejne trzy dni tkanki płukano buforem fosforanowym (0,1 M, pH 7,4, w temperaturze 4°C), a następnie przez co najmniej 3 tygodnie narządy przechowywano w 18% zbuforowanym roztworze sacharozy (w 4°C). Następnie tkanki zamrożono (w temp. -

22°C), pocięto za pomocą kriostatu (Microm, HM 525, Walldorf, Niemcy) na skrawki o grubości 10 µm i umieszczono na szkiełkach mikroskopowych.

Metoda immunofluorescencji podwójnej

Skrawki żołądka i okrężnicy poddano standardowej technice podwójnej immunofluorescencji (Gonkowski i in. 2009). Technika ta składała się z następujących etapów (wszystkie etapy przeprowadzano w temperaturze pokojowej): 1) suszenie przez 1 h; 2) inkubacja (1h) przy użyciu roztworu „blokującego” (10% surowica końska, 0,1% albumina surowicy bydlęcej, 0,1 MPBS, 1% Triton X-100, 0,05% tiomersal, 0,01% dodatek sodu); 3) inkubacja w komorze wilgotnej z mieszaniną dwóch przeciwciał pierwotnych (przez noc). Jedno z przeciwciał skierowane było przeciwko produktowi genu proteinowego (ang. protein gene product 9.5 – PGP 9.5) użytego jako marker panneuronalny, a drugie przeciwko jednej z pozostałych aktywnych substancji objętych badaniem. Specyfikację przeciwciał użytych w niniejszym badaniu przedstawiono w Tabeli 1. 4) Inkubacja (1 h) z mieszaniną swoistych gatunkowo przeciwciał wtórnych sprzężonych z odpowiednimi fluorochromami (Tabela 1) w celu uwidocznienia kompleksów „antygen – przeciwciało pierwotne”. 5) pokrycie skrawków zbuforowanym glicerolem i nałożenie szkiełek nakrywkowych. Pomiędzy poszczególnymi etapami tkanki płukano w PBS (3x10 min).

Tabela 1: Lista przeciwciał i fluorochromów użytych w badaniach immunohistochemicznych.

Przeciwciała pierwotne				
Antygen	Kod	Gatunek	Rozcieńczenie	Dostawca
PGP 9.5	7863-2004	Mysz	1:1000	BioRad, Hercules, CA,USA
GAL	T-5036	Świnka Morska	1:2000	Peninsula Labs, San Carlos, CA, USA
GAL	AB2233	Świnka Morska	1:2000	EMD Millipore, Burlington, MA, USA
nNOS	AB5380	Królik	1:2000	MercMillipore, DEU
SP	8450-0505	Szczur	1:1000	BioRad
VIP	VA 1285	Królik	1:2000	Enzo Life Sciences; Farmingdale, NY, USA
VIP	9535-0204	Królik	1:2000	BioRad
VACHT	H-V006	Królik	1:2000	Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA, USA
Przeciwciała wtórne				

Fluorochromy	Rozcieńczenie	Dostawca
Ośła anty-mysia IgG sprzężona z Alexa fluor 488	1:1000	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ośła anty-królicza IgG sprzężona z Alexa fluor 546	1:1000	ThermoFisher Scientific,
Ośła anty-szczurza IgG sprzężona z Alexa fluor 546	1:1000	ThermoFisher Scientific,
Ośła skierowana przeciwko świnie morskiej IgG sprzężona z Alexa fluor 546	1:1000	ThermoFisher Scientific,
Ośła anty-mysia IgG sprzężona z Alexa fluor 488	1:1000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ośła anty-królicza IgG sprzężona z Alexa fluor 546	1:1000	Invitrogen
Ośła anty-szczurza IgG sprzężona z Alexa fluor 546	1:1000	Invitrogen
Ośła skierowana przeciwko świnie morskiej IgG sprzężona z Alexa fluor 546	1:1000	Invitrogen

Kontrola specyficzności przeciwciał użytych w niniejszych doświadczeniach polegała na pre-adsorpcji surowicy pierwotnej z odpowiednim antygenem, metodzie “wymiany”, w której zamiast pierwotnego przeciwciała używano surowic nieimmunizowanych zwierząt oraz metodzie “opuszczenia”, czyli niestosowaniu przeciwciał pierwotnych (skrawki inkubowano tylko z przeciwciałami wtórnymi). Przy zastosowaniu wyżej wymienionych metod uzyskiwano negatywny wynik barwień immunohistochemicznych.

Ocena mikroskopowa barwień immunofluorescencyjnych

Analizę tkanek przeprowadzono przy użyciu mikroskopu immunofluorescencyjnego Olympus BX51 (Japonia) z odpowiednimi zestawami filtrów połączonych z aparatem Olympus XM10.

W celu ustalenia odsetka neuronów immunoreaktywnych wobec poszczególnych substancji aktywnych zbadano co najmniej 500 komórek immunoreaktywnych wobec PGP 9,5 pochodzących z każdego typu zwojów śródściennych od każdego zwierzęcia pod kątem obecności każdego z objętych niniejszym badaniem czynnika neuronalnego. Do badania włączono tylko komórki z dobrze widocznym jądrem komórkowym. Liczbę komórek PGP 9,5 – dodatnich przyjęto za 100%. Aby nie liczyć dwa razy tej samej komórki, zbadano fragmenty tkanek oddalone od siebie o co najmniej 100 μm . Uzyskane wyniki zostały zebrane i przedstawione jako średnia \pm SEM.

Ponadto, aby porównać w jaki sposób BPA i BPS wpływają na ogólną liczbę neuronów jelitowych w neuronach ściany żołądka i okrężnicy myszy, oceniono liczbę wszystkich komórek zawierających PGP 9,5 w zwojach śródściennych u każdego badanego zwierzęcia. Komórki zliczono w 50 zwojach (dla każdego typu zwoju) zlokalizowanych na co najmniej 10 szkiełkach (skrawki narządów znajdowały się w odległości co najmniej 200 μm od siebie).

Do analizy statystycznej wszystkich uzyskanych wyników wykorzystano testy Anova (Statistica 13, StatSoft, Inc., Kraków, Polska), a różnice uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

4.3.4 Omówienie wyników

Eksperyment I

W doświadczeniu odnotowano obecność wszystkich badanych neuroprzekaźników w neuronach ENS zlokalizowanych w ścianie żołądka i okrężnicy świni. Ponadto stwierdzono, że obydwie badane dawki BPA zmieniały liczbę komórek nerwowych immunoreaktywnych wobec wszystkich badanych substancji. Charakter i nasilenie tych zmian zależały jednak od części jelitowego układu nerwowego, rodzaju badanej substancji oraz dawki BPA.

Wpływ BPA na neurochemiczną charakterystykę neuronów ENS zlokalizowanego na terenie żołądka świni – wyniki opisane w publikacji Makowska K., Gonkowski S. "Bisfenol A (BPA) affects the enteric nervous system in the porcine stomach" Animals, 2020, 10(12):2445

W grupie kontrolnej na terenie żołądka najwyższy odsetek neuronów zarówno w zwojach mięśniowych (MG) jak i podśluzowych (SG) zawierał VAcHT. Substancję tę stwierdzono w $23,11 \pm 0,19\%$ neuronów immunoreaktywnych wobec PGP 9.5 na terenie MG i $34,23 \pm 0,23\%$ w SG. Neurony immunoreaktywne wobec pozostałych badanych substancji były mniej liczne. W przypadku MG neurony zawierające VIP i/lub GAL stanowiły odpowiednio $14,63 \pm 0,18\%$ i $13,50 \pm 0,18\%$, a najmniej liczne były komórki wykazujące obecność SP ($12,16 \pm 0,11\%$). Nieco inna sytuacja miała miejsce na terenie SG, gdzie drugą najliczniejszą populacją (po komórkach VAcHT+) były neurony VIP-pozytywne ($17,57 \pm 0,14\%$). Odsetek komórek nerwowych immunoreaktywnych wobec innych badanych substancji kształtował się na porównywalnym poziomie i wynosił $15,83 \pm 0,12\%$ i $15,09 \pm 0,23\%$ w przypadku komórek zawierających odpowiednio GAL i/lub SP.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że BPA powodował zmniejszenie odsetka neuronów cholinergicznym (VAcHT+) zarówno na terenie SG jak i MG. W obydwu typach zwojów nerwowych zlokalizowanych w ścianie żołądka świni niskie dawki BPA powodowały

zmniejszenie odsetka takich komórek do $31,02 \pm 0,38\%$ i $20,19 \pm 0,26\%$ odpowiednio w SG i MG. Spadek liczby komórek nerwowych immunoreaktywnych wobec VACHT był wyraźniejszy u zwierząt poddanych wyższym dawkom BPA, gdzie populacja takich neuronów w SG stanowiła $25,11 \pm 0,22\%$, a w MG $17,42 \pm 0,22\%$ wszystkich komórek zawierających PGP 9.5.

Obydwie badane dawki BPA powodowały wzrost liczby neuronów zawierających GAL i/lub SP zarówno w MG jak i SG. W MG odsetek neuronów GAL-pozytywnych kształtował się na poziomie $18,29 \pm 0,13\%$ w grupie zwierząt SBPA1 i $21,93 \pm 0,16\%$ w grupie SBPA2. W przypadku neuronów SP+ odnotowano nieco mniej wyraźne zmiany. Odsetek komórek pozytywnych dla SP pod wpływem niskich dawek BPA wzrastał do $14,54 \pm 0,14\%$, a pod wpływem dawek wysokich do $17,78 \pm 0,22\%$. W SG niskie dawki BPA powodowały podobne zmiany w populacjach neuronów immunoreaktywnych wobec SP i/lub GAL, których odsetek wynosił odpowiednio $20,57 \pm 0,10\%$ i $20,45 \pm 0,11\%$ wszystkich komórek zawierających PGP 9.5. U zwierząt otrzymujących wysokie dawki BPA najbardziej widoczne zmiany dotyczyły neuronów GAL+, których odsetek wynosił $24,37 \pm 0,16\%$. Natomiast odsetek neuronów SP+ wynosił $22,80 \pm 0,15\%$. Ciekawą sytuację odnotowano w przypadku komórek nerwowych immunoreaktywnych wobec VIP. W MG niskie dawki BPA powodowały wzrost odsetka takich neuronów do $17,12 \pm 0,26\%$, a dawki wysokie do $18,81 \pm 0,19\%$. Natomiast w SG po podaniu BPA odnotowano spadek liczby neuronów VIP-pozytywnych do $14,35 \pm 0,13\%$ w grupie SBPA1 i do $13,38 \pm 0,14\%$ w grupie SBPA2.

Wpływ BPA na neurochemiczną charakterystykę neuronów ENS zlokalizowanego na terenie okrężnicy zstępującej świni – wyniki opisane w publikacji Makowska K., Gonkowski S. "Changes in the enteric neurons containing selected active substances in the porcine descending colon after the administration of bisphenol A (BPA)" Int. J. Environ. Res. Public Health 2022, 19, 16187.

W warunkach fizjologicznych liczba neuronów immunoreaktywnych wobec VIP i/lub VACHT w ścianie okrężnicy była podobna do liczby takich komórek na terenie żołądka. Odsetek neuronów jelitowych zawierających VIP wynosił $16,05 \pm 0,1\%$ w ISG, $16,72 \pm 0,18\%$ w OSG i $17,55 \pm 0,22\%$ w MG. Z kolei liczba komórek immunoreaktywnych wobec VACHT była wyższa i wynosiła w ISG $26,11 \pm 0,12\%$, w OSG $27,28 \pm 0,16\%$, a w MG $24,28 \pm 0,12\%$. Jeżeli chodzi o neurony immunoreaktywne wobec SP i/lub GAL to ich liczba w ścianie okrężnicy była wyższa niż w ścianie żołądka. Neurony zawierające SP stanowiły $22,60 \pm 0,11\%$ wszystkich komórek immunoreaktywnych wobec PGP 9,5 w obrębie ISG. Natomiast na terenie

w OSG i MG liczba takich komórek była nieco mniejsza i wynosiła odpowiednio $17,33 \pm 0,15\%$ i $18,78 \pm 0,15\%$. Z kolei liczba neuronów GAL-pozytywnych w ISG wyniosła $17,39 \pm 0,14\%$, w OSG $31,36 \pm 0,13\%$, a w MG $34,30 \pm 0,22\%$.

Podawanie obydwu dawek BPA powodowało wzrost odsetka neuronów zawierających SP we wszystkich typach zwojów. W przypadku podawania niskich dawek BPA odsetek neuronów SP-immunoreaktywnych wynosił $23,69 \pm 0,12\%$ w ISG, $21,83 \pm 0,10\%$ w OSG i $20,88 \pm 0,13\%$ w MG. Po podaniu wysokich dawek BPA wartości te wynosiły odpowiednio $30,27 \pm 0,17\%$, $24,65 \pm 0,23\%$ i $24,21 \pm 0,16\%$.

Obydwie dawki BPA powodowały również wzrost odsetka neuronów zawierających VIP we wszystkich typach zwojów śródściennych. W ISG procent VIP-pozytywnych komórek nerwowych wynosił odpowiednio $22,62 \pm 0,17\%$ i $29,82 \pm 0,36\%$ po podaniu niskiej i wysokiej dawki BPA. Wyraźniejsze zmiany zaobserwowano w OSG, gdzie niskie dawki BPA powodowały wzrost liczby komórek VIP+ do $22,56 \pm 0,22\%$, a dawki wysokie nawet do $31,96 \pm 0,22\%$. Z kolei w MG odsetek neuronów VIP-pozytywnych w grupie SBPA1 wynosił $22,67 \pm 0,17\%$, a w grupie SBPA2 $29,05 \pm 0,17\%$.

W przeciwieństwie do neuronów SP-pozytywnych, liczba neuronów zawierających VACHT w ścianie okrężnicy (podobnie jak w ścianie żołądka) zmniejszała się pod wpływem BPA. Najbardziej widoczne zmiany odnotowano w OSG, gdzie odsetek neuronów VACHT-immunoreaktywnych zmniejszył się do $22,28 \pm 0,23\%$ u zwierząt otrzymujących niskie dawki BPA i do $19,27 \pm 0,11\%$ otrzymujących dawki wysokie. W ISG i MG zmiany były mniej wyraźne. W ISG odsetek neuronów VACHT-pozytywnych wynosił odpowiednio $20,33 \pm 0,14\%$ i $18,10 \pm 0,13\%$ wszystkich komórek zawierających PGP 9.5 w grupie SBPA1 i SBPA2. Z kolei w MG niska dawka BPA powodowała spadek odsetka neuronów VACHT-dodatnich do $23,33 \pm 0,18\%$, a dawka wysoka do $20,36 \pm 0,15\%$.

W badaniach zaobserwowano również indukowane przez BPA zmniejszenie liczby neuronów zawierających GAL w obrębie wszystkich typów zwojów śródściennych. U zwierząt otrzymujących niską dawkę BPA odsetek takich neuronów wynosił $25,69 \pm 0,14\%$ w ISG, $27,15 \pm 0,07\%$ w OSG i $14,72 \pm 0,1\%$ w MG. Pod wpływem wysokich dawek BPA zmniejszenie liczby GAL-pozytywnych neuronów było jeszcze wyraźniejsze. Ich odsetek wynosił bowiem odpowiednio $22,25 \pm 0,16\%$, $16,50 \pm 0,19\%$ i $12,19 \pm 0,07\%$ w ISG, OSG i MG.

Eksperyment II

Porównanie wpływu BPA i BPS na neurochemiczną charakterystykę neuronów ENS zlokalizowanego na terenie żołądka myszy – wyniki opisane w publikacjach Makowska K., Calka J., Gonkowski S. “Effects of the long-term influence of bisphenol A and bisphenol S on the population of nitrergic neurons in the enteric nervous system of the mouse stomach”, Scientific Reports, 2023, 13(1):331 i Makowska K., Gonkowski S. “Changes caused by bisphenols in the chemical coding of neurons of the enteric nervous system of mouse stomach” International Journal of Environmental Research and Public Health, 2023, 20, 5125.

W grupie kontrolnej najliczniejszą populacją neuronów zarówno w MG, jak i SG były neurony immunoreaktywne wobec VChT. Ich odsetek w MG wynosił $54,41 \pm 0,41\%$ wszystkich komórek PGP 9,5-dodatnich, a w SG wartość ta osiągała $51,70 \pm 0,64\%$. Neurony zawierające GAL, nNOS i/lub VIP były mniej liczne. Obecność tych czynników neuronalnych stwierdzono w ok. jednej trzeciej wszystkich neuronów znakowanych PGP 9,5. Na terenie SG neurony zawierające GAL stanowiły $30,37 \pm 0,90\%$, zawierające nNOS $30,58 \pm 0,88\%$, a zawierające VIP $31,31 \pm 0,62\%$. W obrębie MG wartości te wyniosły odpowiednio $32,84 \pm 0,46\%$, $32,40 \pm 0,57$ i $38,85 \pm 0,84\%$. Najmniej liczną populacją były neurony SP - immunoreaktywne. Ich odsetek wyniósł $20,73 \pm 1,43\%$ w MG i $14,98 \pm 0,84\%$ w SG.

Badania wykazały, że odsetek neuronów immunoreaktywnych wobec GAL, nNOS, VIP i/lub SP wzrastał pod wpływem zarówno BPA jak i BPS, jednak poziom obserwowanych zmian zależał od typu zwoju nerwowego, rodzaju podawanego bisfenolu i wysokości jego dawki.

W przypadku BPA wszystkie zmiany obserwowane po podaniu mniejszej i większej dawki (grupy MBPA1 i MBPA2) były istotne statystycznie. W grupie MBPA1 odsetek komórek nerwowych immunoreaktywnych wobec GAL wynosił $37,89 \pm 0,61\%$ w MG oraz $35,32 \pm 0,65\%$ w SG, neuronów zawierających VIP $41,4 \pm 0,40\%$ w MG i $35,08 \pm 1,15\%$ w SG, a neuronów nNOS-pozytywnych $38,36 \pm 0,81\%$ w MG i $38,49 \pm 0,77\%$ w SG. W grupie MBPA1 odnotowano również wzrost liczebności populacji neuronów SP-immunoreaktywnych, których odsetek osiągał poziom $31,44 \pm 3,47\%$ w MG i $27,92 \pm 0,7\%$ w SG.

Co ciekawe, ekspozycja na wyższą dawkę BPA (grupa MBPA2) nie spowodowała dalszego wzrostu liczby neuronów nNOS-dodatnich w SG, gdzie ich odsetek był bardzo zbliżony do odsetka obserwowanego w grupie MBPA1 i wynosił $38,14 \pm 0,57\%$. W

przeciwieństwie do SG odsetek neuronów zawierających nNOS w MG pod wpływem wyższych dawek BPA był wyraźnie wyższy od wartości notowanych po podaniu niższych dawek tej substancji i kształtował się na poziomie $44,86 \pm 0,74\%$ wszystkich komórek zawierających PGP 9.5.

W przypadku komórek immunoreaktywnych wobec GAL, VIP i/lub SP zmiany spowodowane wyższą dawką BPA były bardziej widoczne. Odsetek neuronów GAL+ osiągał poziom $43,6 \pm 0,82\%$ w MG i $38,08 \pm 0,84\%$ w SG. Jeżeli chodzi o neurony immunoreaktywne wobec VIP wartości te wynosiły odpowiednio $44,24 \pm 1,02\%$ i $42,82 \pm 0,184\%$. Nieco mniej wyraźne zmiany zaobserwowano w populacji neuronów zawierających SP, których odsetek wyniósł $36,7 \pm 2,08\%$ w MG i $33,35 \pm 2,16\%$ w SG.

W trakcie badań stwierdzono, że również BPS wpływa na liczebność neuronów immunoreaktywnych wobec nNOS, GAL, VIP i/lub SP zlokalizowanych w ścianie żołądka. Jednakże zmiany te, w porównaniu ze zmianami indukowanymi przez BPA, były mniej widoczne. W MG zwierząt otrzymujących niższe dawki BPS istotnie statystycznie zmiany odnotowano jedynie w przypadku neuronów zawierających VIP i/lub nNOS, których odsetek u zwierząt w grupie MBPS1 wynosił odpowiednio $39,76 \pm 0,58\%$ i $34,44 \pm 0,60\%$ wszystkich komórek immunoreaktywnych wobec PGP 9.5. Natomiast w przypadku SG istotny statystycznie wzrost odsetka dotyczył tylko komórek zawierających SP (z $14,98 \pm 0,84$ do $23,52 \pm 1,18\%$).

Bardziej widoczne zmiany odnotowano w grupie zwierząt poddanych działaniu wyższych dawek BPS. Statystycznie istotny wzrost w obu typach zwojów śródściennych odnotowano w przypadku neuronów GAL-pozytywnych (których odsetek w grupie MBPS2 osiągał poziom $35,27 \pm 0,57\%$ w MG i $35,01 \pm 1,00\%$ w SG), neuronów zawierających nNOS (których odsetek wynosił odpowiednio $35,02 \pm 0,89\%$ i $34,02 \pm 0,95\%$) oraz neuronów SP-pozytywnych (których odsetek wynosił odpowiednio $28,03 \pm 1,30\%$ i $30,34 \pm 2,56\%$). Z kolei w przypadku komórek nerwowych zawierających VIP wyższa dawka BPS powodowała statystycznie istotny wzrost ich odsetka jedynie w MG (do $39,44 \pm 0,94\%$).

W przeciwieństwie do wyżej wymienionych populacji neuronalnych odsetek komórek zawierających VACHT zmniejszał się pod wpływem obydwu badanych bisfenoli. Po podaniu niższej dawki BPA obecność VACHT odnotowano w $48,05 \pm 0,72\%$ komórek zawierających PGP 9.5 w MG i w $46,52 \pm 0,98\%$ komórek w SG. Zmiany były bardziej widoczne u zwierząt poddanych wyższej dawce BPA, pod wpływem której odsetek VACHT – dodatnich komórek osiągał poziom $39,69 \pm 0,38\%$ w MG i $36,62 \pm 1,43\%$ w SG. Liczebność neuronów VACHT-

pozytywnych zmniejszała się także pod wpływem BPS. U zwierząt otrzymujących niższą dawkę BPS takie neurony stanowiły $49,88 \pm 0,97\%$ w MG i $48,59 \pm 0,24\%$ w SG. Z kolei u zwierząt narażonych na wyższą dawkę BPS odsetek neuronów zawierających VACHT wynosił $45,32 \pm 1,04\%$ komórek immunoreaktywnych wobec PGP 9,5 w MG i $44,18 \pm 1,06\%$ w SG.

W trakcie niniejszych badań stwierdzono również, że zarówno BPA, jak i BPS wpływają na ogólną liczbę neuronów jelitowych. Zmiany polegały na zmniejszeniu liczby neuronów, ale były one widoczne jedynie pod wpływem wyższych dawek bisfenoli. W MG myszy kontrolnych średnia ogólna liczba neuronów w 50 zwojach wynosiła $837,7 \pm 27,01$ komórek. Mniejsze dawki bisfenoli nie zmieniały tej liczby w sposób istotny statystycznie, gdyż w grupie MBPA1 stwierdzono $796,6 \pm 16,38$ komórek a w grupie MBPS1 $810,9 \pm 38,68$ komórek. Istotny statystycznie spadek ogólnej liczby neuronów w MG odnotowano u zwierząt poddanych działaniu wyższych dawek BPA i BPS, gdzie wartości te osiągnęły odpowiednio $687,0 \pm 29,82$ i $723,6 \pm 15,53$ komórek.

W SG zwierząt kontrolnych średnia całkowita liczba komórek nerwowych w 50 zwojach wynosiła $267,7 \pm 10,56$. U zwierząt narażonych na niższą dawkę BPA wartość ta kształtowała się na poziomie $256,9 \pm 5,60$ komórek, a u zwierząt otrzymujących niższą dawkę BPS $259,9 \pm 7,16$ komórek. Obie te wartości nie różniły się istotnie statystycznie od liczby neuronów obserwowanych u zwierząt kontrolnych. Wyższe dawki obydwu badanych bisfenoli powodowały statystycznie istotny spadek liczby neuronów zlokalizowanych w SG. Liczba neuronów wynosiła $229,1 \pm 6,94$ komórek i $233,3 \pm 7,18$ komórek u myszy narażonych odpowiednio na wysokie dawki BPA i BPS.

Porównanie wpływu BPA i BPS na neurochemiczną charakterystykę neuronów ENS zlokalizowanego na terenie okrężnicy myszy – wyniki opisane w publikacji Makowska K., Lepiarczyk E., Gonkowski S., „The comparison of the influence of bisphenol A (BPA) and its analogue bisphenol S (BPS) on the enteric nervous system of the distal colon in mice” Nutrients, 2023, 15,200

Podczas badania stwierdzono obecność neuronów zawierających, VACHT, GAL, VIP, nNOS i/lub SP w zwojach śródściennych okrężnicy myszy zarówno u zwierząt kontrolnych jak i u zwierząt, którym podawano bisfenole. W warunkach fizjologicznych w MG najliczniejszą grupą neuronów były komórki zawierające VACHT, które stanowiły $48,55 \pm 3,66\%$ wszystkich komórek immunoreaktywnych wobec PGP 9.5. Nieco mniejszy odsetek komórek wykazywał obecność nNOS ($38,83 \pm 1,49\%$), VIP ($37,14 \pm 1,68\%$) i/lub SP ($31,02 \pm 1,49\%$). Z kolei neurony zawierające GAL były najmniej liczne, a ich odsetek wynosił $17,53 \pm 1,95\%$. W SG

zwierząt kontrolnych najliczniejszą populację neuronów stanowiły komórki immunoreaktywne wobec VIP ($28,64 \pm 1,13\%$). Odsetek neuronów zawierających VAcHT i/lub nNOS wynosił odpowiednio $21,64 \pm 1,38\%$ i $20,25 \pm 0,97\%$. Najmniej liczne były komórki immunoreaktywne wobec SP ($13,20 \pm 1,05\%$) i/lub GAL ($13,00 \pm 0,73\%$).

Obydwie badane dawki BPA powodowały wzrost odsetka neuronów zawierających wszystkie substancje aktywne objęte doświadczeniem. W MG najbardziej widoczne zmiany odnotowano w przypadku neuronów VIP-dodatnich. Ich odsetek u zwierząt otrzymujących niższe dawki BPA wynosił $50,39 \pm 1,69\%$, a u zwierząt, gdzie podane dawki były wyższe $64,86 \pm 1,49\%$. W przypadku neuronów GAL-pozytywnych nasilenie zmian było nieco mniejsze, a odsetek tych neuronów wynosił odpowiednio $29,38 \pm 2,38\%$ i $44,18 \pm 3,09\%$. Wyraźnie mniej widoczne zmiany dotyczyły komórek SP-dodatnich (których odsetek kształtował się na poziomie $43,5 \pm 1,83\%$ w grupie zwierząt MBPA1 i $53,21 \pm 4,14\%$ w grupie zwierząt MBPA2) oraz neuronów VAcHT-pozytywnych (których odsetek wynosił odpowiednio $60,12 \pm 1,34\%$ i $66,67 \pm 1,07\%$). Najmniej widoczne zmiany odnotowano w populacji neuronów zawierających nNOS. Ich odsetek pod wpływem niższej dawki BPA wzrastał do $48,42 \pm 3,83\%$, a u zwierząt otrzymujących dawki wyższe do $52,17 \pm 4,05\%$.

W SG BPA powodował również wzrost liczebności wszystkich badanych populacji neuronów. Najbardziej widoczne zmiany odnotowano w przypadku komórek VAcHT-dodatnich. Ich liczba wzrosła do $41,85 \pm 1,39\%$ wszystkich komórek PGP 9,5-dodatnich w grupie MBPA1 i do $69,44 \pm 1,91\%$ w grupie MBPA2. Odsetek neuronów zawierających VIP również ulegał wyraźnym zmianom i wynosił $42,89 \pm 2,29\%$ w grupie MBPA1 i $60,78 \pm 3,12\%$ w grupie MBPA2.

Liczebność populacji neuronów GAL- i/lub SP-dodatnich zlokalizowanych w SG również zwiększała się pod wpływem obydwu dawek BPA. W grupie MBPA1 odsetek neuronów GAL-pozytywnych wynosił $21,35 \pm 2,62\%$, a w grupie MBPA2 $31,53 \pm 3,02\%$. W przypadku neuronów zawierających SP wartości te wynosiły odpowiednio $21,11 \pm 2,75\%$ i $31,40 \pm 3,41\%$. Najmniej widoczne zmiany dotyczyły neuronów nNOS-dodatnich. Ich odsetek osiągał poziom $26,09 \pm 1,48\%$ i $36,96 \pm 3,41\%$ odpowiednio w grupach MBPA1 i MBPA2.

BPS, podobnie jak BPA, powodował wzrost odsetka neuronów zlokalizowanych w obydwu typach zwojów śródściennych okrężnicy immunoreaktywnych wobec wszystkich badanych substancji aktywnych. W MG najbardziej widoczne zmiany odnotowano w przypadku neuronów zawierających VIP i/lub GAL. Odsetek neuronów VIP-dodatnich wynosił $69,74 \pm 3,36\%$ wszystkich komórek PGP 9,5-dodatnich w grupie MBPS1 i $74,01 \pm 1,82\%$ w

grupie MBPS2. W przypadku neuronów zawierających GAL wartości te osiągały poziom odpowiednio $33,37 \pm 1,45\%$ i $49,98 \pm 1,89\%$. Zatem wpływ BPS na populacje neuronów MG zawierających VIP i/lub GAL był wyraźniejszy niż wpływ BPA. Wyraźniejszy wpływ BPS był również widoczny w przypadku komórek immunoreaktywnych wobec nNOS i/lub VACHT. Odsetek neuronów nNOS-dodatnich wynosił $50,05 \pm 2,90\%$ wszystkich komórek PGP 9,5-dodatnich w grupie MBPS1 i $68,98 \pm 2,63\%$ w grupie MBPS2. Z kolei odsetek neuronów zawierających VACHT wynosił odpowiednio $63,09 \pm 1,31\%$ i $69,09 \pm 1,31\%$. Wyraźniejszy wpływ niższych dawek BPS (w porównaniu z BPA) był również widoczny w odniesieniu do komórek SP-dodatnich, których odsetek w grupie MBPS1 wynosił $48,01 \pm 2,86\%$. Z kolei pod wpływem wyższej dawki BPS odsetek komórek SP-immunoreaktywnych osiągał poziom $53,23 \pm 2,99\%$ i był zbliżony do poziomu odnotowanego pod wpływem wyższej dawki BPA.

W SG obydwie użyte dawki BPS działały silniej niż BPA na populację neuronów VIP-i/lub VACHT-pozytywnych. Odsetek neuronów zawierających VIP wynosił $53,12 \pm 5,47\%$ wszystkich komórek reagujących na PGP 9,5 w grupie MBPS1 i $55,75 \pm 4,85\%$ w grupie MBPS2. Odsetek neuronów immunoreaktywnych wobec VACHT kształtował się na poziomie $43,88 \pm 4,83\%$ w grupie MBPS1 i $56,17 \pm 2,90\%$ w grupie MBPS2. Podanie BPS powodowało również zmiany odsetka neuronów wykazujących obecność innych badanych czynników neuronalnych. Populacja komórek GAL-dodatnich stanowiła $21,98 \pm 1,26\%$ wszystkich komórek PGP 9,5-dodatnich w grupie MBPS1 i $49,00 \pm 1,95\%$ w grupie MBPS2. Zmiany indukowane BPS obserwowane w populacjach neuronów SP- i/lub nNOS-dodatnich były mniej widoczne. Odsetek komórek zawierających SP wynosił $20,52 \pm 1,69\%$ wszystkich komórek immunoreaktywnych wobec PGP 9,5 w grupie MBPS1 i $31,24 \pm 4,39\%$ w grupie MBPS2. W przypadku neuronów zawierających nNOS wartości te wynosiły odpowiednio $29,63 \pm 1,68\%$ i $34,65 \pm 3,50\%$.

Podczas badania stwierdzono również, że podawanie obydwu bisfenoli powodowało zmniejszenie ogólnej liczby neuronów jelitowych w ścianie okrężnicy. W MG zwierząt kontrolnych średnia ogólna liczba neuronów zawierających PGP 9,5 w 50 zwojach wynosiła $1244 \pm 33,40$ komórek. U zwierząt otrzymujących mniejsze dawki BPA ich liczba była mniejsza i wynosiła $1186 \pm 13,09$, ale nie była to różnica istotna statystycznie. Z kolei wyższa dawka BPA powodowała statystycznie istotny spadek liczby neuronów jelitowych do $1074 \pm 22,04$ komórek. Bardziej widoczny był wpływ BPS. Liczba neuronów pod wpływem odpowiednio niższych i wyższych dawek BPS wyniosła $987 \pm 27,24$ i $970,3 \pm 5,39$. W obu tych przypadkach różnice w porównaniu z grupą kontrolną były istotne statystycznie.

W SG zwierząt kontrolnych średnia ogólna liczba neuronów zliczona w 50 zwojach wynosiła $252,4 \pm 6,52$ komórek. BPA powodował statystycznie istotny spadek liczby komórek do $219,9 \pm 2,27$ u zwierząt otrzymujących niższą dawkę i do $201,1 \pm 2,73$ u zwierząt, którym podawano dawkę wyższą. Podanie BPS powodowało również statystycznie istotny spadek ogólnej liczby komórek nerwowych. Ich liczebność osiągnęła $223,6 \pm 1,41$ i $224,6 \pm 3,77$ u zwierząt otrzymujących odpowiednio niższą i wyższą dawkę BPS.

4.3.5 Dyskusja:

Podczas niniejszego doświadczenia wykazano obecność wszystkich badanych czynników neuronalnych w stosunkowo dużej liczbie neuronów ENS żołądka i okrężnicy zwierząt kontrolnych, zarówno u świni domowej jak i myszy. Obserwacje te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami naukowymi opisującymi występowanie tych substancji aktywnych w ENS na terenie całego przewodu pokarmowego wielu gatunków, w tym człowieka (Sang i Young 1996; Kuwahara i in. 1998; Szymanska i in. 2018a; Kaleczyc i in. 2007; Schemann i Neunlist, 2004). Uzyskane wyniki pozwalają potwierdzić istotną rolę tych substancji w regulacji różnych funkcji żołądka i okrężnicy obydwu badanych gatunków ssaków (Fox-Threlkeld i in. 1991; Furness i in. 2014; Michel i in. 2021; Kasperek i in. 2007; Mourad i in. 2006; de Souza i in. 2021; Korkmaz i Tunçel 2018; Mantyh i in. 1994; Spencer i Hu 2020; Suvas 2017; Vota i in. 2017; Furness i in. 2012).

Co więcej, prezentowane badania wykazały znaczący wpływ BPA na populację neuronów immunoreaktywnych wobec wybranych neuroprzekaźników na terenie ENS żołądka i okrężnicy badanych zwierząt. Generalnie obserwacje te są zgodne z wcześniejszymi badaniami dotyczącymi wpływu czynników toksycznych na przewód pokarmowy i potwierdzają zdolność neuronów jelitowych do zmiany swojej charakterystyki neurochemicznej pod wpływem działania substancji toksycznych (Palus i in. 2019; Gonkowski i in. 2020; Mikołajczyk i in. 2017).

Zaobserwowane różnice między wynikami uzyskanymi w obydwu eksperymentach mogą wynikać przede wszystkim ze znacznych różnic w anatomii przewodu pokarmowego myszy i świni domowej a także ze stosunkowo dobrze znanych międzygatunkowych różnic w organizacji ENS i charakterystyce neurochemicznej neuronów jelitowych (Furness i in. 2012; Furness i in. 2014). Ponadto, rozbieżności te mogą wynikać z faktu, że w obu przypadkach badano różne dawki BPA. Był to zabieg celowy, ponieważ wiadomo, że poziomy dawek uznawanych za szkodliwe różnią się między gatunkami ssaków, co wynika z odmiennego

metabolizmu BPA w poszczególnych grupach zwierząt (Sakamoto i in. 2002; Peillex i in. 2021).

Z drugiej strony, podczas analizy wyników zauważono także pewne podobieństwa. W obydwu eksperymentach, na terenie żołądka BPA powodował wzrost odsetka neuronów zawierających SP i GAL oraz spadek liczby komórek VACHT-dodatnich. Z kolei w okrężnicy zarówno świń jak i myszy zaobserwowano wzrost liczebności komórek nerwowych immunoreaktywnych wobec SP i/lub VIP, a także spadek liczby neuronów immunoreaktywnych wobec GAL. Odnotowane podobieństwa mogą sugerować podobny mechanizm toksyczny BPA w neuronach jelitowych myszy i świń.

Ponadto, BPA w odmienny sposób wpływał na populacje neuronów GAL, VIP oraz VACHT-pozytywnych w różnych odcinkach przewodu pokarmowego w obrębie tego samego gatunku. Prawdopodobnie może to wynikać z różnic w dokładnych funkcjach czynników neuronalnych w zależności od odcinka przewodu pokarmowego znanych ze wcześniejszych badań (Brzozowska i Całka 2021; Furness 2000; Furness i in. 2014) oraz powszechnie znanych znaczących różnic w charakterze procesów zachodzących w żołądku i jelicie grubym.

W większości badanych zwojów nerwowych odnotowano zmniejszenie liczebności neuronów cholinergicznym pod wpływem działania BPA. Obserwacja ta jest zgodna z wcześniejszymi badaniami dotyczącymi zmian ekspresji neuroprzekaźników i/lub neuromodulatorów w autonomicznym układzie nerwowym innych narządów w odpowiedzi na działanie tej toksyny (Rytel 2018; Szymanska i in. 2018 a,b Gonkowski 2020). Co więcej, na terenie przewodu pokarmowego również odnotowano zmniejszenie ilości struktur nerwowych immunoreaktywnych wobec VACHT pod wpływem działania szerokiej gamy bodźców patologicznych i toksycznych (Saffrey 2013; Palus i in. 2019). Takie obserwacje mogą sugerować, że synteza acetylocholiny jest blokowana w stanach patologicznych. W przypadku BPA redukcja liczby neuronów zawierających acetylocholiny – najważniejszy neuronalny czynnik indukujący skurcz mięśni gładkich przewodu pokarmowego (Spencer i Hu 2020; Li i Furness 2000) może być przyczyną stosunkowo dobrze poznanego rozkurczającego działania tej substancji (Ambreen i in. 2019).

Z drugiej strony, spadek liczby cholinergicznym struktur nerwowych w ścianie przewodu pokarmowego może być związany z bezpośrednim wpływem BPA na układ nerwowy i działaniem neurotoksycznym tej substancji, objawiającym się upośledzeniem rozwoju i funkcji

synaps, a także zmiany ekspresji neuroprotein i przez błonowego transportu jonów (Xu i in. 2013; Szymanska i in. 2018a; Wright i in. 2017; Mokra i in. 2015).

Co ciekawe, w okrężnicy myszy zaobserwowano odwrotną sytuację. W tym przypadku populacja VACHT - immunoreaktywnych neuronów jelitowych zarówno w zwojach podśluzowych jak i mięśniowych w obydwu badanych grupach eksperymentalnych wzrosła w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej. Przyczyna tej sytuacji nie jest jasna. Należy zaznaczyć, że bisfenole w różnym stopniu oddziałują na poszczególne odcinki przewodu pokarmowego, co wynika z ich metabolizmu (de Silva i in. 2017; Deng i in. 2021; Godlewski i Kmiec 2020). Wiadomo, że na ścianę okrężnicy wpływają nie tylko wolne bisfenole, ale także ich metabolity powstające w jelicie cienkim, które również mają działanie toksyczne (Peillex i in. 2021). Ponadto przyczyną innej reakcji neuronów ENS może być także fakt, że bisfenole wchłaniane są również w jelicie grubym (Sakamoto i in. 2002).

W populacji neuronów immunoreaktywnych wobec GAL zaobserwowano zmiany pomiędzy badanymi odcinkami przewodu pokarmowego. W zwojach jelitowych ENS żołądka liczebność komórek GAL+ wzrosła, natomiast w okrężnicy zmniejszyła się pod wpływem BPA zarówno u świń jak i u myszy. Sytuacja taka z jednej strony może być związana z różnymi funkcjami GAL w zależności od odcinka przewodu pokarmowego znanymi z wcześniejszych badań (Mourad i in. 2006; Botella i in. 1992), a z drugiej strony z nieokreślonymi różnicami wpływu BPA na żołądek, jelito cienkie i grube. Powszechnie wiadomo, że GAL pełni rolę troficzną w układzie nerwowym i chroni neurony podczas chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera i Parkinsona (Fang i in. 2017). Na terenie przewodu pokarmowego oprócz właściwości neuroprotektoryjnych (Ding i in. 2006; Raghavendra Rao i in. 2002), GAL reguluje aktywność wydzielniczą, perystaltykę, przepływ krwi i procesy immunologiczne (Palus i in. 2019; Piqueras i in. 2004; Psichas i in. 2016; Lang i in. 2007). Zatem obserwowane wahania liczby neuronów GAL+ mogą być również efektem wywołanych przez BPA zaburzeń w funkcjonowaniu bariery jelitowej lub prozapalnym działaniem tej substancji (Gonkowski i in. 2010; Brzozowska i Całka 2021).

Liczba komórek nerwowych immunoreaktywnych wobec SP we wszystkich badanych elementach ENS zarówno na terenie żołądka jak i okrężnicy obydwu gadanych gatunków zwierząt wzrosła pod wpływem BPA. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami, w których odnotowano wzrost liczby takich struktur nerwowych w trakcie różnych procesów patologicznych na terenie przewodu pokarmowego (Lu i in. 2016; Mantyh i in. 1994; Suvas 2017; Kasperek i in. 2007). Takie zmiany mogą być efektem procesów neuroprotektoryjnych,

gdyż wiadomo, że SP bierze udział w takich procesach o charakterze adaptacyjnym i ochronnych zachodzących w tkance nerwowej (Wang i in. 2015). Jednakże, wzrost liczby struktur nerwowych immunoreaktywnych wobec SP może także wynikać z indukowanych przez BPA procesów o charakterze zapalnym. Z jednej strony, wiadomo, że BPA nie tylko oddziałuje na błonę śluzową przewodu pokarmowego, prowadząc do nasilenia apoptozy, zahamowania wydzielania mucyn i przzerwania bariery jelitowej, ale także powoduje wzrost ekspresji cytokin prozapalnych (Zhao i in. 2019; Qu i in. 2018). Z drugiej strony, SP jest kluczową substancją prozapalną, która pełni wiele ważnych funkcji w aktywacji układu immunologicznego, prowadząc do wzrostu syntezy i ekspresji czynnika martwicy nowotworów alfa oraz interleukin, w tym IL-1 i IL-6 (Yamaguchi i in. 2020).

Jeżeli chodzi o neurony VIP⁺ to w przebiegu niniejszego doświadczenia w większości grup zwierząt poddanych działaniu bisfenoli zaobserwowano wzrost liczebności ich populacji. Podobne obserwacje dotyczyły neuronów nitregicznych (nNOS-immunoreaktywnych) badanych w ENS żołądka i okrężnicy myszy. Ze względu na szeroki zakres niepożądanych działań BPA oraz różne funkcje VIP i tlenku azotu (NO) w jelitach dość trudno jest określić dokładny mechanizm zaobserwowanych zmian. Prawdopodobnie wzrost ilości neuronów VIP i/lub nNOS-immunoreaktywnych ma związek z udziałem tych substancji w mechanizmach adaptacyjnych i/lub ochronnych oraz innych procesach zachodzących pod wpływem toksycznego działania BPA. Zarówno VIP jak i NO są przeciwutleniaczami i głównymi jelitowymi czynnikami hamującym motorykę i sekrecję przewodu pokarmowego (Furness i in. 2014; Kasperek i in. 2007). Ponadto substancje te wykazują również właściwości przeciwzapalne i neuroprotektcyjne (de Souza i in. 2021; Vota i in. 2017; Deng i in. 2019; Korkmaz i Tunçel 2018; Szymanska i in. 2018b; Mourad i in. 2006).

Co ciekawe, w zwojach podśluzowych żołądka świni domowej odnotowano spadek liczby komórek VIP-dodatnich u zwierząt otrzymujących BPA. Zaobserwowaną zmianę można wytłumaczyć na dwa sposoby. Po pierwsze, dokładne (wciąż nie do końca poznane) funkcje VIP w zwojach podśluzowych żołądka świni różnią się od jego funkcji w jelicie cienkim i grubym, co skutkuje różnymi reakcjami neuronów VIP-dodatnich w odpowiedzi na czynniki patologiczne. Takie różne reakcje zostały opisane we wcześniejszych badaniach dotyczących żołądka świni (Kaleczyc i in. 2007b). Ponadto obserwowany w prezentowanych badaniach spadek liczby neuronów podśluzowych zawierających VIP pod wpływem BPA może być związany ze zwiększonym zapotrzebowaniem na tę substancję, która znana jest jako środek

neuroprotektyny i przeciwzapalny w synapsach i zakończeniach nerwowych (Vasina i in. 2006).

Należy zaznaczyć, że wpływ BPA na przewód pokarmowy jest wielokierunkowy. Istnieją doniesienia, że zatrucie BPA zmienia mikroflorę jelitową (Feng i in. 2019) i motorykę jelit (Sarkar i in. 2016). Hamowanie motoryki przewodu pokarmowego wywołane przez BPA może być jednym z mechanizmów ułatwiających wchłanianie tej substancji i tym samym zwiększa toksyczność ogólnoustrojową (Inoue i in. 2003). Wiadomo również, że większości chorób okrężnicy, takich jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego, nowotwory czy aganglionozę towarzyszą zaburzenia motoryki okrężnicy, które mogą wynikać z narażenia na BPA (Sarkar i in. 2016; Wang i in. 2019; Jun i in. 2021). Potwierdzają to wcześniejsze badania, w których wykazano korelacje między wysokim stopniem ekspozycji na BPA, a niektórymi procesami patologicznymi w okrężnicy zstępującej (Wang i in. 2018). Należy podkreślić, że BPA nie tylko wpływa na motorykę przewodu pokarmowego, ale także zwiększa przepuszczalność błony śluzowej poprzez uszkodzenie bariery jelitowej (Feng i in. 2019), a także indukuje apoptozę i dysfunkcję mitochondriów w komórkach błony śluzowej żołądka i jelit, co wiąże się z indukowanym przez BPA stresem oksydacyjnym i procesami zapalnymi (Feng i in. 2019; Wang i in. 2019). Wszystkie wymienione powyżej efekty działania BPA mogą mieć odzwierciedlenie w obserwowanych w niniejszym badaniu zmianach dotyczących neurochemicznej charakterystyki neuronów jelitowych.

W prezentowanym doświadczeniu po raz pierwszy porównano efekty działania BPA oraz jego głównego analogu BPS na jelitowy układ nerwowy wybranych odcinków przewodu pokarmowego myszy. Należy podkreślić, iż do tej pory nie istniały informacje na temat wpływu BPS na neurochemiczną charakterystykę neuronów jelitowych. Uzyskane wyniki wyraźnie wykazują podobną aktywność obydwu badanych bisfenoli. Mianowicie BPS indukował, podobnie jak BPA, wyraźne zmiany w kodowaniu neurochemicznym neuronów w ENS żołądka i okrężnicy myszy.

Zaobserwowane podobieństwa działania BPA i BPS z jednej strony wynikają prawdopodobnie ze zbliżonej budowy chemicznej tych związków i podobnym działaniem endokrynnie czynnym, a z drugiej potwierdzają, że obydwie objęte doświadczeniem substancje mają podobny wpływ na układ nerwowy. Jest to zgodne z najnowszymi badaniami, które w przeciwieństwie do starszych doniesień dowiodły, że BPS można również uznać za substancję zaburzającą gospodarkę hormonalną i oddziałującą na organizmy żywe w podobny sposób jak BPA (Bousoumah i in. 2021; Fouyet i in. 2021; Marroqui i in. 2021; An i in. 2021).

Co więcej, w zwojach jelitowych na terenie okrężnicy myszy w stosunku do niektórych populacji neuronalnych zaobserwowano nawet silniejszy efekt działania BPS niż BPA. Ponadto, BPS (w porównaniu do BPA) miał wyraźniejszy wpływ na zmniejszenie średniej ogólnej liczby komórek nerwowych na terenie zwoju mięśniowego ENS okrężnicy. Takie obserwacje są zgodne z wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że BPS może wykazywać silniejsze niż BPA działanie zaburzające gospodarkę hormonalną, a jego wpływ na niektóre narządy i układy wewnętrzne jest bardziej szkodliwy (Thoene i in. 2020).

4.3.6 Podsumowanie i wnioski:

- I. BPA podawany w stosunkowo niskich dawkach (0,05 mg/kg m.c./dzień oraz 0,5 mg/kg m.c./dzień w przypadku świni domowej oraz 5 mg/kg m.c./dzień i 50 mg/kg m.c./dzień w przypadku myszy) wpływa na neurochemiczną charakterystykę neuronów zlokalizowanych w ścianie żołądka i okrężnicy obydwu badanych gatunków zwierząt. Prawdopodobnie obserwowane zmiany w jelitowym układzie nerwowym są związane z neurotoksycznym i prozapalnym działaniem BPA i wynikają z procesów neuroprotekcyjnych i adaptacyjnych. Na szczególną uwagę zasługują zmiany w jelitowym układzie nerwowym żołądka i okrężnicy świni na skutek działania niskiej dawki BPA (0,05 mg/kg m.c./dobę). Jak już wcześniej wspomniano, w ustawodawstwach niektórych krajów dawka ta jest wymieniana jako TDI lub dawka referencyjna dla BPA, jednak wyniki uzyskane w niniejszym eksperymencie udowadniają, że nie jest ona obojętna dla organizmu.
- II. Obydwa badane bisfenole w wyższych dawkach wykazują wyraźne działanie neurotoksyczne objawiające się spadkiem ogólnej liczby neuronów w jelitowym układzie nerwowym. Ponadto, działanie to jest podobne w przypadku BPA i BPS. Jednakże niższe dawki bisfenoli nie wpływały na ogólną liczbę neuronów, co sugeruje, że zmiany w neurochemicznej charakterystyce komórek nerwowych nie są jedynie związane z neurotoksycznymi właściwościami bisfenoli, lecz najprawdopodobniej wynikają również z reakcji adaptacyjnych w obrębie przewodu pokarmowego.
- III. Zarówno w żołądku jak i okrężnicy myszy w warunkach fizjologicznych zaobserwowano znaczny odsetek neuronów immunoreaktywnych wobec GAL, nNOS, SP, VIP i/lub VACHT we wszystkich typach zwojów ENS. W obydwu badanych narządach, zarówno w zwojach podśluzowych jak i mięśniowych najliczniejsza była populacja komórek nerwowych VACHT – pozytywnych, natomiast najmniej liczna populacja neuronów zawierających SP.

IV. Zarówno BPA jak i BPS zmieniają neurochemiczną charakterystykę neuronów jelitowego układu nerwowego u myszy nawet przy stosunkowo niskich dawkach, tj. dawce NOAEL ustalonej dla BPA, która w poprzednich badaniach nie powodowała działań niepożądanych. Po raz pierwszy wykazano, że wysokie dawki BPS działają na jelitowy układ nerwowy myszy w podobnym stopniu jak BPA. Zmiany odsetka neuronów jelitowych zawierających różne neuronalne substancje aktywne sugerują, że bisfenole oddziałują na różne klasy neuronów pełniących różne funkcje, co potwierdza wielokierunkowy wpływ obu badanych bisfenoli na organizmy żywe.

4.3.7 Piśmiennictwo:

- 1) Suzuki K, Ishikawa K, Sugiyama K, Furuta H, Nishimura F. Content and release of bisphenol A from polycarbonate dental products. *Dent Mater J.* 2000, 19: 389–395.
- 2) Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007, 24: 139–177.
- 3) Michałowicz J. Bisphenol A-sources, toxicity and biotransformation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2014, 37: 738-758.
- 4) Bloom MS, Mok-Lin E, Fujimoto VY. Bisphenol A and ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril.* 2016, 106: 857-863
- 5) Gao X, Wang HS. Impact of bisphenol a on the cardiovascular system - epidemiological and experimental evidence and molecular mechanisms. *Int J Environ Res Public Health.* 2014, 11: 8399-413.
- 6) Konieczna A, Rutkowska A, Rachoń D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 2015, 66: 5-11.
- 7) Almeida S, Raposo A, Almeida-Gonzales M, Carrascosa C. Bisphenol A: Food exposure and impact on human health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf* 2018, 17: 1503–1517.
- 8) Wang H, Zhao P, Huang Q, Chi Y, Dong S, Fan J. Bisphenol-A induces neurodegeneration through disturbance of intracellular calcium homeostasis in human embryonic stem cells-derived cortical neurons. *Chemosphere* 2019, 229: 618-630.
- 9) Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011, 127: 27-34.
- 10) Charitos IA, Topi S, Gagliano-Candela R, De Nitto E, Polimeno L, Montagnani M, Santacroce L. The toxic effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on gut microbiota: Bisphenol A (BPA). A review. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2022, 22: 716-727.
- 11) Frankowski R, Zgoła-Grześkowiak A, Grześkowiak T, Sójka K. The presence of bisphenol A in the thermal paper in the face of changing European regulations—A comparative global research. *Environ. Pollut.* 2020, 265: 114879.
- 12) Efsa J. Opinion of the scientific Panel on food additives, flavorings, processing aids and materials in contact with food on a request from the Commission to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane (Bisphenol A). *EFSA J.* 2006, 428: 1-75.
- 13) Rogers JA, Metz L, Yong VW. Review: endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol.* 2013, 53: 421-430.
- 14) Grob K, Gürtler R, Husøy T, et al. Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: executive summary. *EFSA J.* 2015, 13: 3978-4599

- 15) Aloisi AM, Della Seta D, Rendo C, Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Farabollini F. Exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects pain behavior induced by subcutaneous formalin injection in male and female rats. *Brain Res.* 2002, 937: 1–7.
- 16) Braniste V, Jouault A, Gaultier E, Polizzi A, Buisson-Brenac C, Leveque M, Martin PG, Theodorou V, Fioramonti J, Houdeau E. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107:448–453.
- 17) Caporossi L, Papaleo B. Bisphenol A and Metabolic Diseases: Challenges for Occupational Medicine. *Int J Environ Res Public Health.* 2017, 14: pii: E959.
- 18) Gramec Skledar D, Peterlin Mašič L. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016, 47:182-199.
- 19) Usman A, Ahmad M. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere.* 2016, 158:131-142.
- 20) Rosenfeld CS. Neuroendocrine disruption in animal models due to exposure to bisphenol A analogues. *Front Neuroendocrinol.* 2017, pii: S0091-3022:30044-4.
- 21) Qiu W, Chen B, Greer JB, Magnuson JT, Xiong Y, Zhong H, Andrzejczyk NE, Zheng C, Schlenk D. Transcriptomic Responses of Bisphenol S Predict Involvement of Immune Function in the Cardiotoxicity of Early Life-Stage Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol*, 2020, 54(5): 2869-2877.
- 22) Thoene M, Dzika E, Gonkowski S, Wojtkiewicz J. Bisphenol S in food causes hormonal and obesogenic effects comparable to or worse than bisphenol A: A literature review. *Nutrients* 2020, 12: 532.
- 23) Sarkar K, Tarafder P, Paul G. Bisphenol A inhibits duodenal movement ex vivo of rat through nitric oxide-mediated soluble guanylyl cyclase and α -adrenergic signaling pathways. *J Appl Toxicol.* 2016, 36:131-139.
- 24) Qu W, Zhao Z, Chen S, Zhang L, Wu D, Chen Z. Bisphenol A suppresses proliferation and induces apoptosis in colonic epithelial cells through mitochondrial and MAPK/AKT pathways. *Life Sci.* 2018, 208:167-174.
- 25) Feng L, Chen S, Zhang L, Qu W, Chen Z. Bisphenol A increases intestinal permeability through disrupting intestinal barrier function in mice. *Environ Pollut.* 2019, 254: 112960.
- 26) Liu W, Fu D, Zhang X, Chai J, Tian S, Han J. Development and validation of a new artificial gastric digestive system. *Food Res Int*, 2019, 122: 183-190.
- 27) Parathan P, Wang Y, Leembruggen AJ, Bornstein JC, Foong JP. The enteric nervous system undergoes significant chemical and synaptic maturation during adolescence in mice. *Dev. Biol.* 2020, 458: 75-87.
- 28) Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol.* 2014, 817: 39-71.
- 29) Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012, 9: 286-294.
- 30) Kaleczyc J, Klimczuk M, Franke-Radowiecka A, Sienkiewicz W, Majewski M, Łakomy M. The distribution and chemical coding of intramural neurons supplying the porcine stomach - the study on normal pigs and on animals suffering from swine dysentery. *Anat Histol Embryol* 2007, 36: 186-93.
- 31) Wojtkiewicz J, Równiak M, Crayton R, Majewski M, Gonkowski S. Chemical coding of zinc-enriched neurons in the intramural ganglia of the porcine jejunum. *Cell Tissue Res.* 2012, 350:215-223.
- 32) Makowska K, Obremski K, Zielonka L, Gonkowski S. The Influence of Low Doses of Zearalenone and T-2 Toxin on Calcitonin Gene Related Peptide-Like Immunoreactive (CGRP-LI) Neurons in the ENS of the Porcine Descending Colon. *Toxins (Basel).* 2017, 9 pii: E98.

- 33) The F, Cailotto C, van der Vliet J, de Jonge WJ, Bennink RJ, Buijs RM, Boeckxstaens GE. Central activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces surgical inflammation in experimental post-operative ileus. *Br. J. Pharmacol.* 2011, 163: 1007–1016.
- 34) Norton CE, Grunz-Borgmann EA, Hart ML, Jones BW, Franklin CL, Boerman EM. Role of perivascular nerve and sensory neurotransmitter dysfunction in inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2021, 320: H1887-H1902.
- 35) Nezami BG, Srinivasan S. Enteric nervous system in the small intestine: pathophysiology and clinical implications. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2010, 12: 358–365.
- 36) Velarde E, Alonso-Gómez AL, Azpeleta C, Isorna E, Delgado MJ. Melatonin attenuates the acetylcholine-induced contraction in isolated intestine of a teleost fish. *J. Comp. Physiol. B.* 2009, 179: 951-959.
- 37) Lu P, Luo H, Quan X, Fan H, Tang Q, Yu G, Chen W, Xia H. The role of substance P in the maintenance of colonic hypermotility induced by repeated stress in rats. *Neuropeptides* 2016, 56: 75-82.
- 38) Van Geldre LA, Lefebvre RA. Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation. *Curr. Pharm. Des.* 2004, 10: 2483-97.
- 39) Bohlen HG. Rapid and slow nitric oxide responses during conducted vasodilation in the in vivo intestine and brain cortex microvasculatures. *Microcirculation* 2011, 18: 623-634.
- 40) Currò D, Preziosi P. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the rat stomach. *Gen. Pharmacol.* 1998, 31: 697-703.
- 41) Brzozowska M, Calka J. Review: Occurrence and distribution of galanin in the physiological and inflammatory states in the mammalian gastrointestinal tract. *Front Immunol.* 2021, 11: 602070.
- 42) Koller A, Bianchini R, Schlager S, Münz C, Kofler B, Wiesmayr S. The neuropeptide galanin modulates natural killer cell function. *Neuropeptides* 2017, 64: 109–115.
- 43) Breneman DE, Philips TM, Hauser J, Hill JM, Spong CY, Gozes I. Complex array of cytokines released by vasoactive intestinal peptide. *Neuropeptides* 2003, 37: 111-119.
- 44) Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci* 2006, 126-127: 264-272.
- 45) Giaroni C, De Ponti F, Cosentino M, Lecchini S, Frigo G. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology.* 1999, 117: 1438-1458.
- 46) Palmer JM, Wong-Riley M, Sharkey KA. Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in nematode-infected guinea pigs. *Am. J. Physiol.* 1998, 275: G922–G935.
- 47) Berezina TP, Ovsyannikov VI. Mechanism for the inhibition of contractile activity of the gastric antrum and pylorus in rabbits during psychogenic stress. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009, 147: 296-300.
- 48) Gonkowski S, Burlinski P, Calka J. Proliferative enteropathy (PE)-induced changes in galanin-like immunoreactivity in the enteric nervous system of the porcine distal colon. *Acta Vet. Beograd.* 2009, 59: 321–330.
- 49) Gonkowski S, Burlinski P, Skobowiat C, Majewski M, Calka J. Inflammation- and axotomy-induced changes in galanin – like immunoreactive (GAL-LI) nerve structures in the porcine descending colon. *Acta Vet Hung.* 2010, 58: 91-103.
- 50) Di Giancamillo A, Vitari F, Bosi G, Savoini G, Domeneghini C. The chemical code of porcine enteric neurons and the number of enteric glial cells are altered by dietary probiotics. *Neurogastroenterol. Motil.* 2010, 22: e271–e278.
- 51) Szymanska K, Makowska K, Gonkowski S. The Influence of High and Low Doses of Bisphenol A (BPA) on the Enteric Nervous System of the Porcine Ileum. *Int J Mol Sci.* 2018a, 19: 917.
- 52) Szymanska K, Calka J, Gonkowski S. Nitric oxide as an active substance in the enteric neurons of the porcine digestive tract in physiological conditions and under intoxication with bisphenol A (BPA). *Nitric Oxide* 2018b, 80: 1-11.

- 53) Chaudhry SR, Liman MNP, Peterson DC. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Stomach. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
- 54) Tanaka M, Kawamoto T, Matsumoto H. Distribution of ¹⁴C-bisphenol A in pregnant and newborn mice. *Dent Mater* 2010, 26: e181-187.
- 55) Inoue H, Yuki G, Yokota H, Kato S. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab Dispos.* 2003, 31: 140-144.
- 56) Sakamoto H, Yokota H, Kibe R, Sayama Y, Yuasa A. Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002, 1573: 171-176.
- 57) Peillex C, Kerever A, Lachhab A, Pelletier M. Bisphenol A, bisphenol S and their glucuronidated metabolites modulate glycolysis and functional responses of human neutrophils. *Environ. Res.* 2021, 196: 110336.
- 58) Kosugi I, Tada T, Tsutsui Y, Sato Y, Mitsui T, Itazu I. Giant inflammatory polyposis of the descending colon associated with a Crohn's disease-like colitis. *Pathol Int.* 2002, 52:318–321.
- 59) Rychlik A, Gonkowski S, Nowicki M, Calka J. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript immunoreactive nerve fibres in the mucosal layer of the canine gastrointestinal tract under physiological conditions and in inflammatory bowel disease. *Vet Med Czech.* 2015, 60:361–367.
- 60) Kinugasa T, Akagi Y. Status of colitis-associated cancer in ulcerative colitis. *World J Gastrointest Oncol.* 2016, 8:351–357.
- 61) Javurek AB, Spollen WG, Johnson SA, Bivens NJ, Bromert KH, Givan SA, Rosenfeld CS. Effects of exposure to bisphenol A and ethinyl estradiol on the gut microbiota of parents and their offspring in a rodent model. *Gut Microbes.* 2016, 7:471-485.
- 62) Xu J, Huang G, Guo TL. Developmental Bisphenol A Exposure Modulates Immune-Related Diseases. *Toxics.* 2016, 4:23.
- 63) DeLuca JA, Allred KF, Menon R, Riordan R, Weeks BR, Jayaraman A, Allred CD. Bisphenol-A alters microbiota metabolites derived from aromatic amino acids and worsens disease activity during colitis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018, 243:864-875.
- 64) Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter JM. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 2002, 68:121-146.
- 65) Choi CW, Jeong JY, Hwang MS, Jung KK, Lee KH, Lee HM. Establishment of the korean tolerable daily intake of bisphenol a based on risk assessments by an expert committee. *Toxicol Res.* 2010, 26:285-291.
- 66) Zielinska M, Wojnowska-Baryla I, Cydzik-Kwiatkowska A. Bisphenol A Removal from Water and Wastewater. Springer International Publishing, 2018, ISBN: 978-3-319-92361-1
- 67) Dobrzynska MM, Gajowik A, Jankowska-Steifer EA, Radzikowska J, Tyrkiel EJ. Reproductive and developmental F1 toxicity following exposure of pubescent F0 male mice to bisphenol A alone and in a combination with X-rays irradiation. *Toxicology.* 2018, 410:142-151.
- 68) Rezg R, Abot A, Mornagui B, Aydi S, Knauf C. Effects of Bisphenol S on hypothalamic neuropeptides regulating feeding behavior and apelin/APJ system in mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018, 161:459-466.
- 69) Sang Q, Young HM. Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res,* 1996, 284: 39-53.
- 70) Kuwahara A, Kuramoto H, Kadowaki M. 5-HT activates nitric oxide-generating neurons to stimulate chloride secretion in Guinea pig distal colon. *Am. J. Physiol,* 1998, 275: G829-G834.
- 71) Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil,* 2004, 16: 55–59.

- 72) Fox-Threlkeld JA, McDonald TJ, Cipris S, Woskowska Z, Daniel EE. Galanin inhibition of vasoactive intestinal polypeptide release and circular muscle motility in the isolated perfused canine ileum. *Gastroenterology*. 1991, 101: 1471-1476.
- 73) Michel K, Krüger D, Schäuffele S, Zeller F, Demir IE, Theisen J, Schemann M. Fast synaptic excitatory neurotransmission in the human submucosal plexus. *Neurogastroenterol Motil*. 2021, 33: e14164.
- 74) Mourad FH, Barada KA, Bou Rached NA, Khoury CI, Saadé NE, Nassar CF. Inhibitory effect of experimental colitis on fluid absorption in rat jejunum: role of the enteric nervous system, VIP, and nitric oxide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006, 290: G262-268.
- 75) de Souza FRO, Ribeiro FM, d' Almeida Lima PM. Implications of VIP and PACAP in Parkinson's disease: what do we know so far? *Curr Med Chem*. 2021, 28: 1703-1715.
- 76) Korkmaz OT, Tunçel N. Advantages of Vasoactive Intestinal Peptide for the Future Treatment of Parkinson's Disease. *Curr Pharm Des*. 2018, 24: 4693-4701.
- 77) Mantyh CR, Vigna SR, Maggio JE, Mantyh PW, Bollinger RR, Pappas TN. Substance P binding sites on intestinal lymphoid aggregates and blood vessels in inflammatory bowel disease correspond to authentic NK-1 receptors. *Neurosci Lett*. 1994, 178: 255-259.
- 78) Spencer NJ, Hu H. Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020, 17: 338-351.
- 79) Suvas S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J Immunol*. 2017, 199: 1543-1552.
- 80) Vota D, Aguero M, Grasso E, Hauk V, Gallino L, Soczewski E, Pérez Leirós C, Ramhorst R. Progesterone and VIP cross-talk enhances phagocytosis and anti-inflammatory profile in trophoblast-derived cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2017, 443: 146-154.
- 81) Kasperek MS, Fatima J, Iqbal CW, Duenes JA, Sarr MG. Role of VIP and substance P in NANC innervation in the longitudinal smooth muscle of the rat jejunum - influence of extrinsic denervation. *J Surg Res*. 2007, 141: 22-30.
- 82) Palus K, Obremski K, Bulc M, Całka J. The impact of low and high doses of acrylamide on the intramural neurons of the porcine ileum. *Food Chem Toxicol* 2019, 132: 110673.
- 83) Gonkowski S. Bisphenol A (BPA)-Induced Changes in the Number of Serotonin-Positive Cells in the Mucosal Layer of Porcine Small Intestine—the Preliminary Studies. *Int J Mol Sci* 2020, 21: 1079.
- 84) Mikołajczyk A, Gonkowski S, Złotkowska D. Modulation of the main porcine enteric neuropeptides by a single low-dose of lipopolysaccharide (LPS) *Salmonella* Enteritidis. *Gut Pathog*. 2017, 9: 73.
- 85) Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst*. 2000, 81: 87-96.
- 86) Rytel L. The Influence of Bisphenol A (BPA) on Neuregulin 1-Like Immunoreactive Nerve Fibers in the Wall of Porcine Uterus. *Int J Mol Sci* 2018, 19: pii: E2962.
- 87) Saffrey MJ. Cellular changes in the enteric nervous system during ageing. *Dev. Biol* 2013, 382: 344-355.
- 88) Li ZS, Furness JB. Immunohistochemical localization of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1998, 294: 35-43.
- 89) Ambreen S, Akhtar T, Hameed N, Ashfaq I, Sheikh N. In Vivo Evaluation of Histopathological Alterations and Trace Metals Estimation of the Small Intestine in Bisphenol A-Intoxicated Rats. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2019, 2019: 9292316.
- 90) Xu X, Xie L, Hong X, Ruan Q, Lu H, Zhang Q, Zhang G, Liu X. Perinatal exposure to bisphenol-A inhibits synaptogenesis and affects the synaptic morphological development in offspring male mice. *Chemosphere* 2013, 91: 1073-1081.
- 91) Wright EC, Johnson SA, Hao R, Kowalczyk AS, Greenberg GD, Ordoñez Sanchez E, Laman-Maharg A, Trainor BC, Rosenfeld CS. Exposure to extrinsic stressors, social defeat or bisphenol A,

- eliminates sex differences in DNA methyltransferase expression in the amygdala. *J Neuroendocrinol* 2017, 29: 10.
- 92) Mokra K, Kocia M, Michałowicz J. Bisphenol A and its analogs exhibit different apoptotic potential in peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem Toxicol* 2015, 84: 79-88.
- 93) de Silva PS, Yang X, Korzenik JR, Goldman RH, Arheart KL, Caban-Martinez AJ. Association of urinary phenolic compounds, inflammatory bowel disease and chronic diarrheal symptoms: Evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ. Pollut.* 2017, 229: 621-626.
- 94) Deng Y, He H, Wan H, Shen N, Li J, Zhang S, Zeng Q, Chang J, Lu Q, Zhong R, Miao X. Bisphenol A exposure, interaction with genetic variants and colorectal cancer via mediating oxidative stress biomarkers. *Environ. Pollut.* 2021, 287: 117630.
- 95) Godlewski J, Kmiec Z. Colorectal cancer invasion and atrophy of the enteric nervous system: potential feedback and impact on cancer progression. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21: 3391.
- 96) Botella A, Delvaux M, Frexinos J, Bueno L. Comparative effects of galanin on isolated smooth muscle cells from ileum in five mammalian species. *Life Sci.* 1992, 50: 1253-1261.
- 97) Fang P, Yu M, Wan D, Zhang L, Han L, Shen Z, Shi M, Zhu Y, Zhang Z, Bo P. Regulatory effects of galanin system on development of several age-related chronic diseases. *Exp Gerontol* 2017, 95: 88-97.
- 98) Ding X, MacTavish D, Kar S, Jhamandas JH. Galanin attenuates beta-amyloid (Aβ) toxicity in rat cholinergic basal forebrain neurons. *Neurobiol Dis.* 2006, 21: 413-420.
- 99) Raghavendra Rao VL, Bowen KK, Dhodda VK, Song G, Franklin JL, Gavva NR, Dempsey RJ. Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2002, 83: 1072-1086.
- 100) Piqueras L, Taché Y, Martinez V. Galanin inhibits gastric acid secretion through a somatostatin-independent mechanism in mice. *Peptides.* 2004, 25: 1287-1295.
- 101) Psichas A, Glass LL, Sharp SJ, Reimann F, Gribble FM. Galanin inhibits GLP-1 and GIP secretion via the GAL1 receptor in enteroendocrine L and K cells. *Br J Pharmacol.* 2016, 173: 888-898.
- 102) Lang R, Gundlach AL, Kofler B. The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharm Ther.* 2007, 115: 177-207.
- 103) Wang SY, Chen L, Xue Y, Xia YJ. Substance P prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cytotoxicity through inhibition of apoptosis via neurokinin-1 receptors in MES23.5 cells. *Mol Med Rep* 2015, 12: 8085-8092.
- 104) Zhao Z, Qu W, Wang K, Chen S, Zhang L, Wu D, Chen Z. Bisphenol A inhibits mucin 2 secretion in intestinal goblet cells through mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2019, 111: 901-908.
- 105) Yamaguchi K, Yamazaki S, Kumakura S, Someya A, Iseki M, Inada E, Nagaoka I. Yokukansan, a Japanese Herbal Medicine, suppresses Substance P-induced Production of Interleukin-6 and Interleukin-8 by Human U373 MG Glioblastoma Astrocytoma Cells. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2020, 20:1073-1080.
- 106) Jun JH, Oh JE, Shim JK, Kwak YL, Cho JS. Effects of bisphenol A on the proliferation, migration, and tumor growth of colon cancer cells: In vitro and in vivo evaluation with mechanistic insights related to ERK and 5-HT3. *Food Chem Toxicol.* 2021, 158: 112662.
- 107) Wang Y, Rui M, Nie Y, Lu G. Influence of gastrointestinal tract on metabolism of bisphenol A as determined by in vitro simulated system. *J Hazard Mater.* 2018, 355: 111-118.
- 108) Bousoumah R, Leso V, Iavicoli I, Huuskonen P, Viegas S, Porras SP, Santonen T, Frery N, Robert A, Ndaw S. Biomonitoring of occupational exposure to bisphenol A, bisphenol S and bisphenol F: A systematic review. *Sci. Total. Environ.* 2021, 783: 146905.

- 109) Fouyet S, Olivier E, Leproux P, Dutot M, Rat P. Bisphenol A, bisphenol F, and bisphenol S: The bad and the ugly. Where is the good? *Life* (Basel). 2021, 11: 314.
- 110) Marroqui L, Martinez-Pinna J, Castellano-Muñoz M, Dos Santos RS, Medina-Gali RM, Soriano S, Quesada I, Gustafsson JA, Encinar JA, Nadal A. Bisphenol-S and bisphenol-F alter mouse pancreatic β -cell ion channel expression and activity and insulin release through an estrogen receptor ER β mediated pathway. *Chemosphere* 2021, 265: 129051.
- 111) An H, Yu H, Wei Y, Liu F, Ye J. Disrupted metabolic pathways and potential human diseases induced by bisphenol S. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2021, 88: 103751.

5 Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1 Parametry naukowe dorobku:

- ❖ Łączna liczba punktów ministerialnych opublikowanych artykułów: **4025 pkt**
- ❖ Łączny IF: **165,025***
- ❖ Jako pierwszy autor: **2295 pkt, IF 94,502***

Źródło	Całkowita liczba cytowań	Liczba cytowań bez autocytowań	Indeks Hirsch'a
Web of Science (All Databases)	323	231	11
Web of Science (Core Collection)	317	225	11
Scopus	348	248	11
Google Scholar	397	-	12

	Przed uzyskaniem stopnia doktora			Po uzyskaniu stopnia doktora		
	Liczba publikacji	IF	Liczba punktów ministerialnych	Liczba publikacji	IF	Liczba punktów ministerialnych
Prace opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie JCR	27	85,619	1575	15*	79,406*	2450
Prace opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie JCR, w których jestem pierwszym autorem	12	36,376	675	9*	58,126*	1620

* W marcu 2023 czasopismo *International Journal of Environmental Research and Public Health* wydawnictwa MDPI przestało być indeksowane przez bazę *Web Of Science (WOS)*. Decyzja ta została uzasadniona tym, że czasopismo przestało spełniać kryteria indeksacji czasopism w WOS (*content relevance criterion*). Zarzuty te nie odnosiły się do jakości merytorycznej publikacji, ale do tego, że publikowane były prace o tematyce spoza zakresu tego czasopisma. Na ostatniej liście JCR z 2021 roku wyżej wymienione czasopismo posiadało *impact factor* = 4,614. Odwołanie złożone przez redakcję czasopisma oraz wydawnictwo MDPI jest obecnie rozpatrywane przez *Claritive*. Pomimo iż czasopismo *International Journal of Environmental Research and Public Health* nadal znajduje się w innych bazach indeksujących takich jak *Scopus* czy *Google Scholar*, w związku z powyższym, istnieje duże prawdopodobieństwo, że *International Journal of Environmental Research and Public Health* nie zostanie umieszczone na nowej liście wskaźników wpływu (*Impact Factor*) za lata 2022/2023.

Podane parametry naukowe nie uwzględniają więc publikacji w czasopiśmie *International Journal of Environmental Research and Public Health* z 2022 i 2023 roku. Włączając te publikacje mój dorobek naukowy prezentowałby się inaczej. Według ostatniej listy wskaźników wpływu z 2021 roku łączny *impact factor* wszystkich moich publikacji wynosi **183,481** oraz **108,344** z prac, w których jestem pierwszym autorem. Dla prac opublikowanych po obronie pracy doktorskiej łączny IF wynosi **97,862** a liczba publikacji **19** natomiast w przypadku artykułów, w których jestem pierwszym autorem IF = **71,968** a liczba publikacji = **12**. Dlatego też w załączonej do wniosku analizie bibliometrycznej parametry naukowe mojego dorobku są wyższe niż podane przeze mnie w powyższym podsumowaniu.

5.2 Obszary badawcze mojej pracy naukowej:

W swej pracy naukowej zajmuję się następującymi zagadnieniami

5.2.1 Jelitowy układ nerwowy w warunkach fizjologicznych i w stanach patologicznych

Jelitowy układ nerwowy w warunkach fizjologicznych oraz jego reakcje na różne stany patologiczne to jedno z głównych zagadnień, którymi się zajmuję. Na terenie neuronów jelitowych odkryto dotychczas występowanie ponad 50 substancji neuronalnie aktywnych. Moje badania dotyczą substancji, których dokładne funkcje nie zostały jeszcze poznane. Wśród takich substancji są trzeci transporter cynku (ZnT3) oraz peptyd CART (transkrypt regulowany kokainą i adrenaliną). Należy zaznaczyć, że prace dotyczące tych substancji, w których jestem współautorem, to pionierskie opracowania opisujące po raz pierwszy obecność ZnT3 i CART w ENS przełyku świni i ukazujące neurochemiczną charakterystykę ZnT3 – pozytywnych neuronów przełykowych. Ponadto badania te to pierwsza próba określenia dokładnych funkcji ZnT3 oraz CART w regulacji czynności przełyku.

1. **Makowska K.**, Rytel L., Lech P., Osowski A., Kruminis–Kaszkiel E., Gonkowski S. “Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide in the enteric nervous system of the porcine esophagus.” – *Comptes Rendus Biologies*. 2018, 341: 325-333. ISSN: 1631-0691, IF₂₀₁₈: **1,867**, *Punktacja MNiSW₂₀₁₈*: **30**

2. Wojtkiewicz J., **Makowska K.**, Bejer-Olenska E., Gonkowski S. „Zinc Transporter 3 (Znt3) as an Active Substance in the Enteric Nervous System of the Porcine Esophagus.” - *Journal of Molecular Neuroscience*. 2017, 61:315-324. IF₂₀₁₇: **2,454**, Punktacja MNiSW₂₀₁₇: **20**
3. Wojtkiewicz J., Rytel L., **Makowska K.**, Gonkowski S. „Co-localization of zinc transporter 3 (ZnT3) with sensory neuromediators and/or neuromodulators in the enteric nervous system of the porcine esophagus.” – *Biometals*. 2017, 30:393-403. IF₂₀₁₇: **2,478**, Punktacja MNiSW₂₀₁₇: **30**
4. **Makowska K.**, Gonkowski S. „Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide in mammals gastrointestinal system.” - *Annals of Animal Science*. 2017, 17: 3-21, IF₂₀₁₇: **1,018**, Punktacja MNiSW₂₀₁₇: **20**

Należy zaznaczyć, że jeszcze w okresie studiów byłam członkiem kilku kół naukowych. W ramach działalności w Kole Naukowym Neuroanatomów badałam neurochemiczną charakterystykę struktur jelitowego układu nerwowego na terenie przewodu pokarmowego bobra europejskiego. W 2013 roku za te badania otrzymałam nagrodę główną w Ogólnopolskim Konkursie Weterynaryjnych Studenckich Kół Naukowych Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych a wyniki mojej pracy zostały opublikowane w 2019 roku.

1. Zalecki M., **Makowska K.**, Gizejewski Z., Klimczuk M., Franke-Radowiecka A., Kasica-Jarosz N., Sienkiewicz W. “Enteric nervous system in the European beaver (*Castor fiber*) pylorus - an immunohistochemical study.” *Pol J Vet Sci*. 2019, 22, 101-107. IF₂₀₁₉: **0,516**, Punktacja MNiSW₂₀₁₉: **100**

W czasie studiów doktoranckich, skupiłam się głównie na badaniu ENS świni domowej. Wiadomo bowiem, iż pod względem anatomicznym, elektrofizjologicznym oraz immunohistochemicznym ENS tego gatunku zwierzęcia jest zbliżony do jelitowego układu nerwowego człowieka. Z tego też względu świnia domowa uznawana jest za najbardziej doskonały model zwierzęcy procesów zachodzących w obrębie neuronów jelitowych człowieka zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w przebiegu procesów patologicznych.

Neurony ENS nie tylko regulują większość funkcji przewodu pokarmowego, ale także biorą aktywny udział w procesach adaptacyjnych i protekcyjnych będących odpowiedzią na bodźce zewnętrzne. Czynnikiem zmieniającymi warunki, w których funkcjonują komórki nerwowe mogą być zarówno bodźce fizjologiczne, jak i patologiczne. Do tych pierwszych należy zaliczyć przede wszystkim wzrost, dojrzewanie oraz starzenie się układu nerwowego, a także rodzaj diety. Natomiast do czynników patologicznych należą między innymi schorzenia przewodu pokarmowego, choroby ogólnoustrojowe, zaburzenia metaboliczne, zakażenia pasożytnicze, stres, mechaniczne uszkodzenie przewodu pokarmowego lub nerwów

zaopatrujących żołądek i jelita oraz działanie toksyn i leków, w szczególności tych, które mogą znajdować się w pożywieniu i dostawać się do organizmu drogą pokarmową. W odpowiedzi na wyżej wymienione bodźce, dostosowujące się do zmienionych warunków neurony ENS ulegają adaptacyjnym modyfikacjom morfologicznym, fizjologicznym i/lub elektrofizjologicznym. Jednakże najwyraźniejszą oznaką wyżej wymienionych procesów, które określa się mianem „plastyczności neuronalnej” są zmiany w neurochemicznej charakterystyce komórek nerwowych. Wynikiem mojej działalności w tej dziedzinie są następujące publikacje:

1. **Makowska K.**, Gonkowski S. “Age and Sex-Dependent Differences in the Neurochemical Characterization of Calcitonin Gene-Related Peptide-Like Immunoreactive (CGRP-LI) Nervous Structures in the Porcine Descending Colon” – *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20, 1024, IF₂₀₁₉: **4,556**, Punktacja MNiSW₂₀₁₉: **140**
2. **Makowska K.**, Gonkowski S. “The influence of inflammation and nerve damage on neurochemical characterization of calcitonin gene-related peptide – like immunoreactive (CGRP-LI) neurons in the enteric nervous system of porcine descending colon” – *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): pii: E548. IF₂₀₁₈: **4,183**, Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **30**
3. Gonkowski S., **Makowska K.**, Całka J. „The influence of experimental inflammation and axotomy on distribution of leucine enkephalin (leuENK) in intramural nervous structures of porcine descending colon.” – *BMC Veterinary Research*. 2018, 14:169. IF₂₀₁₈: **1,792**, Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **40**
4. **Makowska K.** “Chemically – induced inflammation and nerve damage affect the distribution of vasoactive intestinal polypeptide – like immunoreactive (VIP-LI) nervous structures in the descending colon of the domestic pig.” – *Neurogastroenterology & Motility*. 2018, 15:e13439. IF₂₀₁₈: **3,803**, Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **30**

Część moich badań dotyczących jelitowego układu nerwowego to analiza wpływu dwóch powszechnie występujących w produktach żywnościowych i paszowych mikotoksyn, a mianowicie zearalenonu (ZEN) oraz toksyny T-2 na unerwienie przewodu pokarmowego. Wiadomo, iż substancje te mogą znajdować się między innymi w kukurydzy, jęczmieniu, pszenicy i ziarnach fasoli i oddziałują negatywnie na organizmy ludzi i zwierząt, powodując między innymi zmiany w układzie rozrodczym, wątrobie, przewodzie pokarmowym i układzie nerwowym. Znaczenie prowadzonych przeze mnie badań polega przede wszystkim na tym, że dotyczą one niskich dawek tych mikotoksyn. Zwierzętom podawano dawki uznane w prawodawstwie europejskim za zupełnie bezpieczne dla ludzi i zwierząt. Jak wykazały prowadzone przeze mnie badania dawki te jednak powodują zmiany w ekspresji neuronalnych substancji aktywnych na terenie ENS w różnych odcinkach przewodu pokarmowego świni

domowej. Otrzymane wyniki mogą być podstawą do zrewidowania poglądów związanych z toksycznym działaniem ZEN i T-2 i powinny skłonić do zmiany przepisów dotyczących dziennego dopuszczalnego spożycia tych substancji zarówno przez ludzi, jak i zwierzęta gospodarskie, a także do ustalenia nowych wartości dawki niewywołującej dających się zaobserwować szkodliwych skutków (NOEL) i najniższej dawki wywołującej objawy szkodliwe (LOAEL). Możliwość wpływu tak niskich dawek mikotoksyn na organizmy żywe była dotychczas marginalizowana, jednakże obserwowane w przeprowadzonych przeze mnie badaniach zmiany w ENS mogą być pierwszym, podklinicznym objawem zatrucia organizmu. Szczególne znaczenie wydaje się mieć fakt, iż już stosunkowo krótkie działanie niskich dawek badanych mikotoksyn nie jest obojętne dla organizmu i niesie ze sobą zmiany w jelitowym układzie nerwowym. Prace dotyczące tych zagadnień to:

1. **Makowska K.**, Gonkowski S., Zielonka L., Dabrowski M., Calka J. „T2 Toxin-Induced Changes in Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CART)-Like Immunoreactivity in the Enteric Nervous System Within Selected Fragments of the Porcine Digestive Tract.” - *Neurotoxicity Research*. 2017, 31:136-147, **IF₂₀₁₇: 3,186**, **Punktacja MNiSW₂₀₁₇: 25**
2. **Makowska K.**, Obremski K., Zielonka L., Gonkowski S. „The Influence of Low Doses of Zearalenone and T-2 Toxin on Calcitonin Gene Related Peptide-Like Immunoreactive (CGRP-LI) Neurons in the ENS of the Porcine Descending Colon.” – *Toxins*. 2017, pii: E98. doi: 10.3390/toxins9030098. **IF₂₀₁₇: 3,273**, **Punktacja MNiSW₂₀₁₇: 35**
3. **Makowska K.**, Obremski K., Gonkowski S. „The Impact of T-2 Toxin on Vasoactive Intestinal Polypeptide-Like Immunoreactive (VIP-LI) Nerve Structures in the Wall of the Porcine Stomach and Duodenum” *Toxins* 2018, 10(4): 138. **IF₂₀₁₈: 3,895**, **Punktacja MNiSW₂₀₁₈: 35**
4. Gonkowski S., Gajęcka M., **Makowska K.** "Mycotoxins and the enteric nervous system – a minireview" *Toxins*, 2020, 12(7):461. **IF₂₀₂₀: 4,546**, **Punktacja MNiSW₂₀₂₀: 100**
5. Rychlik A., Gonkowski S., Kaczmar E., Obremski K., Calka J., **Makowska K.** "The T2 toxin produces by *Fusarium spp* impacts porcine duodenal nitric oxide synthase (nNOS) – positive nervous structures". *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(14):5118. **IF₂₀₂₀: 5,924**, **Punktacja MNiSW₂₀₂₀: 140**

Kolejnym badaniem przeze mnie czynnikiem patologicznym, który może wpływać na plastyczność neuronów jelitowych był wpływ substancji endokrynnie czynnych zanieczyszczających środowisko i żywność, takich jak bisfenol A i akrylamid. Substancje te są szeroko wykorzystywane w przemyśle w związku z czym znajdują się w wielu przedmiotach codziennego użytku i pożywieniu. Z opakowań żywności i naczyń kuchennych mogą przedostawać się do pożywienia i wody lub powstawać podczas obróbki środków spożywczych

a następnie wnikać do organizmów powodując zaburzenia w wielu organach i narządach wewnętrznych. Związki te zaliczane są do ksenoestrogenów, gdyż w znacznym stopniu wpływają na układ hormonalny. Ponadto, znane jest także ich szkodliwe działanie na układ nerwowy, pokarmowy, rozrodczy, wydalniczy oraz krwionośny. Istnieją również przypuszczenia, iż substancje te mogą przyczyniać się do zwiększenia ryzyka wystąpienia nowotworów, chorób metabolicznych, nadciśnienia, zaburzeń pracy serca i chorób neurodegeneracyjnych. W tych pionierskich badaniach wykazano, iż nawet niskie dawki tych substancji nie są neutralne dla żywego organizmu, gdyż powodują zmiany w kodowaniu neurochemicznym neuronów jelitowego układu nerwowego co jak już wspomniano w niniejszej pracy, może być pierwszym, przedklinicznym objawem ich toksycznego działania. Badania podejmujące wyżej wymienioną tematykę opisano w następujących publikacjach:

1. Szymanska K, **Makowska K.**, Calka J, Gonkowski S. “Endocrine disruptor bisphenol A (BPA) affects the enteric neurons immunoreactive to neuregulin 1 (NRG1) in the enteric nervous system of the porcine large intestine” *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22):8743. IF₂₀₂₀: **5,924**, Punktacja MNiSW₂₀₂₀: **140**
2. **Makowska K.**, Szymanska K., Calka J., Gonkowski S. “The Influence of Bisphenol A (BPA) on the Occurrence of Selected Active Substances in Neuregulin 1 (NRG1) – Positive enteric Neurons in the Porcine Large Intestine” *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19):10308. IF₂₀₂₁: **6,208**, Punktacja MEiN₂₀₂₁: **140**
3. Szymanska K, **Makowska K.**, Gonkowski S. “The Influence of High and Low Doses of Bisphenol A (BPA) on the Enteric Nervous System of the Porcine Ileum.” *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(3): pii: E917. IF₂₀₁₈: **4,183**, Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **30**
4. Palus K., **Makowska K.**, Calka J. „Acrylamide- induced alterations in the cocaine- and amphetamine- regulated peptide transcript (CART)-like immunoreactivity within the enteric nervous system of the porcine small intestines.” – *Annals of Anatomy*. 2018, 219: 94-101. IF₂₀₁₈: **2,241**, Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **30**
5. Palus K., **Makowska K.**, Calka C. “Alterations in galanin-like immunoreactivity in the enteric nervous system of the porcine stomach following acrylamide supplementation” – *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13): pii: E3345; IF₂₀₁₉: **4,556**, Punktacja MNiSW₂₀₁₉: **140**

Kolejnym zagadnieniem związanym z jelitowym układem nerwowym, którym zajmuję się w swej pracy naukowej jest wpływ endotoksyn bakteryjnych na unerwienie układu pokarmowego. Badania, w których uczestniczyłam dotyczyły określenia wpływu endotoksyn bakteryjnych *Salmonella Enteritidis* na unerwienie przewodu pokarmowego. Badania wykazały, że endotoksyny bakteryjne powodują zmiany neurochemicznej charakterystyki struktur nerwowych

zlokalizowanych w ścianie narządów układu pokarmowego. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w następujących artykułach:

1. Mikołajczyk A., **Makowska K.**, „Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) in the nerve fibers of the porcine gallbladder wall under physiological conditions and after *Salmonella Enteritidis* lipopolysaccharides administration.” - *Folia Morphologica*. 2017, 76: 596-602. IF₂₀₁₈: **1,593**, Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **35**
2. **Makowska K.**, Mikołajczyk A., Calka J., Gonkowski S. „Neurochemical characterization of nerve fibers in the porcine gallbladder wall under physiological conditions and after administration of *Salmonella Enteritidis* lipopolysaccharides (LPS).” – *Toxicology Research*. 2017, 7: 73-83. IF₂₀₁₇: **0,497**, Punktacja MNiSW₂₀₁₇: **15**

5.2.2 Substancje endokrynnie czynne w organizmach zwierząt domowych, żywności pochodzenia zwierzęcego i środowisku

Ważnym osiągnięciem mojej kariery naukowej, które według mnie szczególnie zasługują na uwagę, są pionierskie badania dotyczące stopnia narażenia psów na substancje endokrynnie czynne zanieczyszczające środowisko. Substancje takie zawarte są w powietrzu, glebie, wodzie oraz żywności. Obok bisfenoli, duże znaczenie mają parabeny substancje perfluoroalkilowe (PFAS). Parabeny to estry kwasu parahydroksybenzoesowego, które są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym. Ze względu na działanie estrogenne parabeny należą do substancji zaburzających gospodarkę hormonalną i mogą wywierać niekorzystny wpływ na organizmy żywe, wpływając na układ hormonalny, immunologiczny i rozrodczy. Z kolei substancje perfluoroalkilowe (PFAS) to duża grupa związków chemicznych powszechnie stosowanych w różnych gałęziach przemysłu, które mogą niekorzystnie oddziaływać na wiele układów i narządów wewnętrznych.

W badaniach oznaczone zostały poziomy wyżej wymienionych substancji toksycznych metodą chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) w sierści psów. Dotychczas głównymi matrycami do badań toksykologicznych były krew i mocz jednak analiza sierści nabiera coraz większego znaczenia ze względu na małą inwazyjność pobierania oraz łatwość przechowywania i transportu próbek. Niniejsze badania to pierwsze oznaczenia narażenia psów na BPA, parabeny oraz PFAS poprzez analizę próbek sierści. Badania były wykonane we współpracy międzynarodowej z Universidad de Sevilla (Hiszpania).

Wykazano, że psy są narażone w znacznym stopniu na działanie toksyn środowiskowych. Oznacza to, że wyżej wymienione związki chemiczne mogą odgrywać ważną

rolę w toksykologii weterynaryjnej jako czynniki sprzyjające powstawaniu różnego typu zaburzeń zdrowotnych. Ponadto badania wykazały, iż analiza sierści w ocenie narażenia psów na związki toksyczne może zastąpić „klasyczne” próbki do badań toksykologicznych, takie jak krew czy mocz.

1. **Makowska K.**, Martin J., Rychlik A., Aparicio I, Santos JL, Alonso E, Gonkowski S. “Assessment of exposure to selected perfluoroalkyl substances (PFASs) in dogs by fur analysis” *Environmental pollution*, 2021, 286:117435. IF₂₀₂₁: **9,988**, Punktacja MEiN₂₀₂₁: **100**
2. **Makowska K.**, Martín J, Rychlik A, Aparicio I, Santos JL, Alonso E, Gonkowski S. “Biomonitoring parabens in dogs using fur sample analysis – preliminary studies” *Science of the Total Environment*, 2022, 807(Pt 1):150757. IF₂₀₂₂: **10,754**, Punktacja MEiN₂₀₂₂: **200**
3. **Makowska K.**, Martín J., Rychlik A., Aparicio I., Santos J.L., Alonso E., Gonkowski S. “Hair Sample Analysis as a Method of Monitoring Exposure to Bisphenol A in Dogs” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(8):4600. Punktacja MEiN₂₀₂₂: **140** (obecnie czasopismo nie posiada IF; na dzień publikacji wynosił on **4,614****)

Jeżeli chodzi o zawartość substancji endokrynnie czynnych w żywności pochodzenia zwierzęcego i środowisku, to podczas pobytu naukowego na Uniwersytecie w Lusace (Zambia) uczestniczyłam w pobraniu próbek wody z jeziora Kariba (główny zbiornik wodny tamtejszego rejonu) oraz suszonych ryb Kapenta (regionalnego przysmaku). Następnie uczestniczyłam w badaniach tych próbek kątem zawartości mikotoksyny ZEN. Okazało się, iż próbki (szczególnie próbki ryb) zawierały badaną toksynę co może przyczyniać się do narażenia konsumentów na ZEN. Należy podkreślić, iż w krajach Afrykańskich nie ma żadnych wytycznych ograniczających zawartość tej toksyny w pożywieniu co stanowi realne zagrożenie zdrowia dla ich mieszkańców. Wyniki opublikowano w artykule:

1. Gonkowski S, Obremski K, **Makowska K.**, Rytel L, Mwaanga ES “Levels of zearalenone and its metabolites in sun-dried kapenta fish and water of Lake Kariba in Zambia - a preliminary study” *Science of the Total Environment*. 2018, 637–638: 1046–1050. IF₂₀₁₈: **5,589**, Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **40**

5.2.3 Wpływ bisfenolu A (BPA) na unerwienie narządów wewnętrznych

Oprócz wpływu BPA na jelitowy układ nerwowy w swej pracy naukowej zajmuję się także wpływem tej substancji na unerwienie innych narządów wewnętrznych. Badania wykazały, że stosunkowo niskie dawki BPA powodują zmiany w strukturach nerwowych zaopatrujących serce i pęcherz moczowy. Uzyskane wyniki opisano w następujących artykułach:

1. **Makowska K.**, Szymanska K., Palus K., Gonkowski S., Calka J., „Wpływ bisfenolu A na kodowanie chemiczne włókien nerwowych koniuszka serca świni domowej.” – *Medycyna Weterynaryjna*. 2017, 73: 572-578. IF₂₀₁₇: **0,197**, Punktacja MNiSW₂₀₁₇: **15**
2. **Makowska K.**, Gonkowski S. “Changes Caused by Low Doses of Bisphenol A (BPA) in the Neuro-Chemistry of Nerves Located in the Porcine Heart” *Animals*, 2021, 11(3):780. IF₂₀₂₁: **3,231**, Punktacja MEiN₂₀₂₁: **100**
3. **Makowska K.**, Lech Piotr, Majewski M, Rychlik A, Gonkowski G. “Bisphenol A affects vipergic nervous structures in the porcine urinary bladder trigone” *Scientific Reports*, 2021, 11(1):12147. IF₂₀₂₁: **4,997**, Punktacja MEiN₂₀₂₁: **140**

5.2.4 Wpływ bisfenolu A na inne układy

Podczas prowadzonych przeze mnie badań zajęłam się także wpływem niskich i wysokich dawek BPA na szpik kostny i mięśnie świni domowej. Wyniki wykazały, że dostający się do organizmu drogą pokarmową BPA zarówno w niskich jak i wysokich dawkach wpływa na hematopoezę mieloidalną w szpiku kostnym. Zaobserwowane zmiany potwierdzają korelację narażenia na BPA z rozwojem anemii w związku ze spadkiem stężenia parametrów czerwonych we krwi obwodowej a te zmiany ostatecznie prowadzą do niedotlenienia organizmu. Stwierdzono również, że BPA dostające się do organizmu drogą pokarmową może odkładać się w mięśniach. Uzyskane wyniki wskazują także, że źródłem BPA w żywności człowieka może być mięso wieprzowe, a obecność BPA w mięsie może wynikać z przyżyciowej ekspozycji zwierząt na tę substancję. Wyniki otrzymane w przebiegu powyższych badań przedstawiono w artykułach:

1. Snarska A., Wysocka D., Rytel L., **Makowska K.**, Gonkowski S. “Cytological evaluation of the influence of high and low doses of bisphenol A on an erythroblastic cell line of porcine bone marrow” – *J Vet Res*. 2018, 62, 2018. IF₂₀₁₈: **0,829**, Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **20**
2. **Makowska K.**, Staniszewska M., Bodziach K., Calka J., Gonkowski S. “Concentrations of bisphenol A (BPA) in fresh pork loin meat under standard stock-farming conditions and after oral exposure – a preliminary study.” *Chemosphere*, 2022, 295:133816. IF₂₀₂₂: **8,493**, Punktacja MEiN₂₀₂₂: **140**

5.2.5 Kliniczne zagadnienia weterynaryjne

Ważna część moich zainteresowań naukowych związana jest z zagadnieniami klinicznymi w weterynarii. Zagadnienia którymi się zajmuję związane są z chorobami psów i kotów. Dlatego też, część mojego dorobku dotyczy przewlekłego nieswoistego zapalenia jelit (IBD) u psów, zwięzienia przełyku u kotów (z zastosowaniem nowatorskiego sposobu leczenia metodą

endoskopową Savary-Gillard), a także innych często występujących jednostek chorobowych u psów i kotów. Zagadnienia kliniczne opisano w następujących opracowaniach:

1. Rychlik A., Gonkowski S., Calka J., **Makowska K.** "Vasoactive intestinal peptide (VIP) in the intestinal mucosal nerve fibers in dogs with inflammatory bowel disease" *Animals*, 2020, 10(10):1759 IF₂₀₂₀: **2,752**, Punktacja MNiSW₂₀₂₀: **100**
2. Rychlik A., Gonkowski S., **Makowska K.**, Kaczmar E., Calka J. "Inflammatory bowel disease – induced changes in intramucosal substance P – positive nerves in the canine colon." *Acta Veterinaria Hungarica.*, 2020 Oct 13;68(2):154-159. IF₂₀₂₀: **0,955**, Punktacja MNiSW₂₀₂₀: **70**
3. Kaczmar E., **Makowska K.**, Rychlik A. "The use of Savary-Gilliard dilators in the treatment of an oesophageal stricture in a cat" *Vet res comm*, 2022, 46(3):955-960. IF₂₀₂₂: **2,816**, Punktacja MEiN₂₀₂₂: **100**
4. **Makowska K.** „Gastric dilatation and torsion in dogs.” w: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze, Weterynaria i hodowla zwierząt.* s. 70-75. Poznań, sierpień 2017. ISBN: 978-83-65677-19-8 – rozdział w monografii wieloautorskiej; Punktacja MNiSW₂₀₁₇: **5**
5. **Makowska K.** „Dysplazja stawów biodrowych u psów.” w: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze, Weterynaria i hodowla zwierząt.* s. 49-55. Poznań, czerwiec 2018. ISBN: 978-83-65677-93-8 – rozdział w monografii wieloautorskiej; Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **5**
6. **Makowska K.** „Otitis externa u psów i kotów.” w: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze, Weterynaria i hodowla zwierząt.* s. 66-72. Poznań, wrzesień 2018. ISBN: 978-83-65917-70-6 – rozdział w monografii wieloautorskiej; Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **5**
7. **Makowska K.** „Kamica układu moczowego u psów.” w: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze, Weterynaria i hodowla zwierząt.* S. 73-79. Poznań, wrzesień 2018. ISBN: 978-83-65917-70-6 – rozdział w monografii wieloautorskiej; Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **5**
8. **Makowska K.** „Zakaźne zapalenie otrzewnej u kotów.” w: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze, Weterynaria i hodowla zwierząt.* s. 105-110, Poznań, sierpień 2019. ISBN: 978-83-66139-81-7 6 – rozdział w monografii wieloautorskiej; Punktacja MNiSW₂₀₁₉: **5**
9. **Makowska K.** „Zespół nabytego niedoboru immunologicznego kotów” w: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze, Weterynaria i hodowla zwierząt.* s. 111-116, Poznań, sierpień 2019. ISBN: 978-83-66139-81-7 6 – rozdział w monografii wieloautorskiej; Punktacja MNiSW₂₀₁₉: **5**

5.2.6 Biomonitoring substancji endokrynnie czynnych u ludzi

W zakresie moich zainteresowań naukowych znajdują się również zagadnienia dotyczące oceny narażenia ludzi na wybrane substancje endokrynnie czynne zanieczyszczające środowisko, a mianowicie parabeny, triklosan oraz BPA i BPS. W tym przypadku matrycą do

badan były włosy, w których poziom wyżej wymienionych związków zbadany został metodą LC-MS. Badania te są owocem współpracy z Wydziałem Lekarskim Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie oraz Laboratorium Nauki i Badań Toksykologicznych, Szkoła Medyczna, Uniwersytet Kreta, Heraklion, Kreta, Grecja.

1. Wojtkiewicz J., Tzatzarakis M., Vakonaki E., **Makowska K.**, Gonkowski S. "Evaluation of human exposure to parabens in northern east Poland through hair samples analysis" *Scientific Reports*, 2021, 11(1):23673. IF₂₀₂₁: **4,997**, Punktacja MEiN₂₀₂₁: **140**
2. Gonkowski S., Tzatzarakis M., Vakonaki E., **Makowska K.**, Tsatsakis AM., Wojtkiewicz J. "The Presence of Triclosan in Human Hair Samples in Poland—A Pilot Study" *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(7):3796. Punktacja MEiN₂₀₂₂: **140** (obecnie czasopismo nie posiada IF; na dzień publikacji wynosił on **4,614****)
3. Gonkowski S., Tzatzarakis M., Dermizaki E., **Makowska K.**, Wojtkiewicz J. "Hair Sample Analysis of residents from Olsztyn, North Eastern Poland, to Evaluate the Levels of Bisphenol S and Bisphenol A – a pilot study" *Medical Science Monitor*, 2022, 28:e936738. IF₂₀₂₂: **3,386**, Punktacja MEiN₂₀₂₂: **140**

5.2.7 Prace przeglądowe z zakresu historii weterynarii i neurologii

Dodatkowo w kręgu moich zainteresowań znajdują się również historia weterynarii i neurobiologii. Dlatego też, w moim dorobku naukowym znajdują się także artykuły i rozdziały w monografiach wieloautorских opisujących dzieje medycyny weterynaryjnej oraz biografie polskich pionierów neurologii i neurobiologii.

1. Gonkowski S., **Makowska K.** "Wacław Blaise Orłowski and his unacknowledged discovery in neurology." *Journal of Neurology*. 2018, 265: 229-230. IF₂₀₁₈: **4,204**, Punktacja MNiSW₂₀₁₈: **35**
2. **Makowska K.**, Szymanska K "Józef Polikarp Brudziński (1874–1917)" *Journal of Neurology*, 2019, 266(2):548-549. IF₂₀₁₉: **3,956**, Punktacja MNiSW₂₀₁₉: **100**
3. **Makowska K.** „Stefan Borowiecki (1881-1937)”- *Journal of Neurology*, 2020. doi.org/10.1007/s00415-019-09334-9. IF₂₀₂₀: **4,849**, Punktacja MNiSW₂₀₂₀: **100**
4. Gonkowski I., Gonkowski S., **Makowska K.** "Ludwik Maurycy Hirschfeld (1814-1876)" *Journal of Neurology*, 2020, 268(6):2304-2306. IF₂₀₂₀: **6,682**, Punktacja MNiSW₂₀₂₀: **100**
5. Gonkowski S, Rytel L, **Makowska K.**, Calka J. Historical Surgical Treatments in Polish Veterinary Medicine. *Animals (Basel)*. 2020, 10(9):E1487. doi: 10.3390/ani10091487. IF₂₀₂₀: **2,752**, Punktacja MNiSW₂₀₂₀: **100**
6. **Makowska K.** „Weterynaryjne leki pochodzenia zwierzęcego w dawnej Polsce.” w: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze, Weterynaria i hodowla zwierząt*. s. 76-

81. Poznań, sierpień 2017. ISBN: 978-83-65677-19-8 – rozdział w monografii wieloautorskiej; Punktacja MNiSW₂₀₁₈: 5
7. **Makowska K.**, Gonkowski I. „Jakub Henryk Lewandowski jako jeden z pionierów medycyny weterynaryjnej w Polsce.” w: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze, Weterynaria i hodowla zwierząt.* s. 127-132. Poznań, czerwiec 2018. ISBN: 978-83-65677-93-8 – rozdział w monografii wieloautorskiej; Punktacja MNiSW₂₀₁₈: 5
8. **Makowska K.**, Gonkowski S. „Edward Flatau (1868-1932) and His Contributions to the Development of Neuroscience and Neurosurgery” w: *Hands-on Science Advancing Science. Improving Education.* Braga, Portugalia, czerwiec 2018. ISBN 978-84-8158-779-1 – rozdział w monografii wieloautorskiej

5.3 Współprace z innymi jednostkami naukowymi:

1. Moja najważniejsza współpraca międzynarodowa trwa od 1.04.2018 z **Prof. Paulo Correia-de-Sá**, który jest kierownikiem **Laboratorium Neurofizjologii i Farmakologii, Uniwersytetu w Porto, Portugalia** (Abel Salazar Biomedical Sciences Institute - University of Porto). Współpraca ta rozpoczęła się w trakcie mojego wyjazdu stażowego (1 - 23.10.2018), podczas którego rozpoczęliśmy wspólne badania naukowe stanowiące badania wstępne do projektu PRELUDIUM 16 (NCN). Po uzyskaniu grantu w 2019 roku kontynuowaliśmy pracę nad porównaniem wpływu bisfenolu A (BPA) i bisfenolu S (BPS) na jelitowy układ nerwowy ze szczególnym uwzględnieniem przekaźnictwa cholinergicznego na terenie zwoju mięśniowego okrężnicy. Badania polegały na analizie wpływu bisfenoli na wyrzut acetylocholin, ATP i adenozyiny z neuronów zwoju mięśniowego okrężnicy myszy. W celu wykonania badań pracowałam w laboratorium ICBAS łącznie przez 3 miesiące. W tym czasie samodzielnie wykonywałam eksperymenty badając wpływ wybranych nanomolowych i mikromolowych stężeń BPA i BPS na uwalnianie acetylocholin przez neurony jelitowych zwojów mięśniowych (LM-MP) wyizolowane z okrężnicy mysiej za pomocą ciekłej spektrometrii scyntylicyjnej. Ponadto uczestniczyłam w pomiarach ATP za pomocą metody bioluminescencji lucyferyny przez lucyferazę a także adenozyiny za pomocą HPLC z matrycą diodową z tych samych tkanek. Na chwilę obecną współpraca jest stale kontynuowana i trwają prace nad artykułem opisującym uzyskane wyniki w ramach projektu PRELUDIUM a także przygotowujemy wniosek na nowy wspólny projekt badawczy. Ponadto, w ramach tej współpracy pełniłam rolę promotora pomocniczego (z ang. co-supervisor) w pracy magisterskiej Erasmus+ Master of Science w zakresie zanieczyszczenia środowiska i toksykologii na kierunku Toksykologia Środowiskowa i Zanieczyszczenia – ICBAS/FCUP studenta z wymiany Yoce Aprianto (czerwiec 2022 rok, „Influence of

bisphenol A (BPA) and bisphenol S (BPS) on cholinergic neurotransmission in the tripartite synapse of the mouse colon”).

Poza laboratorium ICBAS w Porto, od początku studiów doktoranckich udało mi się nawiązać również współpracę z wieloma innymi zarówno krajowymi jak i zagranicznymi ośrodkami naukowymi. Poniżej przedstawiam jednostki naukowe wraz z krótką charakterystyką współpracy:

2. Nazwa ośrodka naukowego: **Katedra Chemii Analitycznej, Uniwersytet w Sewilli, Sevilla, Hiszpania**

- ❖ Data nawiązania współpracy: luty 2020.
- ❖ Charakter współpracy: Wspólne badania naukowe na temat narażenia psów na toksyny środowiskowe poprzez badanie sierści metodą chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS).
- ❖ Efekty współpracy: 3 publikacje naukowe, złożony wniosek grantowy do Morris Animal Foundation w maju 2020, jednakże nie został zakwalifikowany do finansowania.

3. Nazwa ośrodka naukowego: **Pracownia Morfofizjologii Zwierząt, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Stanowy w São Paulo (UNESP), Brazylia**

- ❖ Data nawiązania współpracy: 1.11.2022
- ❖ Charakter współpracy: od 1 listopada 2022 do 31 sierpnia 2023 na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim przebywa na stażu naukowym doktorant Kainã Rocha Cabrera Fagundes, który w trakcie stażu jest pod moją opieką, prace nad wnioskiem grantowym
- ❖ Efekty współpracy: obecnie kończony jest manuskrypt z wyników badań przeprowadzonych razem ze studentem z wymiany a także przygotowany jest plan projektu pt. *„Evaluate biochemical and histological biomarkers of organisms at distinct trophic levels exposed to the interaction of polyamide (nylon) fibers and amoxicillin.”*, wniosek, w którym będę pełnić rolę wykonawcy zostanie złożony w konkursie grantowym w ramach finansowania wewnętrznego UNESP, Brazylia

4. Nazwa ośrodka naukowego: **Klinika i Poradnia Endokrynologii i Nefrologii, Uniwersytet w Lipsku, Niemcy (Universitätsklinikum Leipzig AöR, Medizinische Klinik & Poliklinik III).**

- ❖ Data nawiązania współpracy - 1.06.2016
- ❖ Charakter współpracy: wspólne badania naukowe podczas wyjazdu stażowego w 2016 roku, Efekty współpracy: W 2018 został złożony wspólny projekt, w którym miałam pełnić rolę wykonawcy *„Wpływ bisfenolu S (BPS) na wybrane obszary obwodowego*

układu nerwowego i jelitowego układu odpornościowego świnii” złożony pod nr rejestracyjnym 2017/26/M/NZ7/00066 w konkursie Harmonia, NCN, jednakże nie został zakwalifikowany do finansowania.

5. Nazwa ośrodka naukowego: **Scotland's Rural College (Szkocja), Aarhus University (Dania)**

- ❖ Data nawiązania współpracy: listopad 2019 rok
- ❖ Charakter współpracy: Wspólne badania dotyczące lokalizacji neureguliny-1 i innych substancji aktywnych w neuronach zwojów rdzeniowych świnii domowej będące badaniami pilotażowymi, planowanie badań w ramach wspólnego międzynarodowego projektu badawczego
- ❖ Efekty współpracy: Projekt badań pt. *Investigation of traumatic neuromas and long-term pain conduction in the testicular nerves of surgically-castrated male pigs.* Złożony w konkursie grantowym organizacji Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), w którym miałam pełnić rolę wykonawcy – wniosek został pozytywnie oceniony jednak nie uzyskał finansowania

6. Nazwa ośrodka naukowego: **Uniwersytet Południowoczeski w Czeskich Budziejowicach, Czechy oraz Uniwersytet Medycyny Weterynaryjnej i Farmacji w Koszycach, Słowacja**

- ❖ Data nawiązania współpracy: grudzień 2017 rok
- ❖ Charakter współpracy: planowanie wspólnych badań, praca nad wnioskiem grantowym
- ❖ Efekty współpracy: Projekt badań pt. *„The evaluation of the risk of exposition on bisphenol A (BPA) in Visegrád group countries by the determination of BPA levels in the serum of dogs.”* złożony w konkursie grantowym fundacji International Visegrad Fund, w którym miałam pełnić rolę kierownika projektu – wniosek został pozytywnie oceniony jednak nie uzyskał finansowania

7. Nazwa ośrodka naukowego: **Wydział Rolnictwa i Leśnictwa, UWM w Olsztynie, Polska**

- ❖ Data nawiązania współpracy: 2017 rok
- ❖ Charakter współpracy: planowanie wspólnych badań, praca nad wnioskiem grantowym
- ❖ Efekty współpracy: Złożony w organizacji Winn Feline Foundation projekt badań, w których miałam pełnić rolę kierownika projektu pt. *„Risk of intoxication with bisphenol A and relationship between health status and serum levels of this substance in domestic cats.”* wniosek został pozytywnie oceniony jednak nie uzyskał finansowania

8. Nazwa ośrodka naukowego: **Uniwersytet Zambijski w Lusace, Zambia**

- ❖ Data nawiązania współpracy: 1.05.2017.

- ❖ Charakter współpracy: W trakcie pobytu naukowego (28.06.2017 – 23.07.2017) rozpoczęcie wspólnych badań naukowych, pobranie tkanek od dzikich zwierząt afrykańskich, szkolenie zespołu badaczy z Uniwersytetu Zambijskiego z zakresu pobierania oraz utrwalania tkanek do dalszych oznaczeń immunohistochemicznych oraz z zakresu metodyki barwień immufluorescencyjnych, pobranie próbek żywności oraz wody z jezior do badań toksykologicznych oraz mikotoksykologicznych.
 - ❖ Efekty współpracy: opublikowanie wyników wspólnej pracy naukowej (*Science of the Total Environment*. 2018, 637–638: 1046–1050).
9. Nazwa ośrodka naukowego: **Laboratorium Nauki i Badań Toksykologicznych, Szkoła Medyczna, Uniwersytet Kreta, Heraklion, Kreta, Grecja**
- ❖ Data nawiązania współpracy: 2021 rok
 - ❖ Charakter współpracy: wspólne badania naukowe dotyczące narażenia ludzi na wybrane toksyny środowiskowe poprzez badanie włosów, prace nad wnioskiem grantowym w celu badań na temat określenia wpływu substancji zaburzających gospodarkę hormonalną na stan zdrowia kotów
 - ❖ Efekty współpracy: 2 artykuły naukowe, w grudniu 2022 roku złożony wniosek na dofinansowanie badań pt. „Exposure of cats to endocrine disruptors polluting the environment - risk factors and impact on a health status” z fundacji EveryCat Health Foundation, w którym będę pełnić rolę wykonawcy
10. Nazwa ośrodka naukowego: **Wydział Nauk Biologicznych i Technologii Rolnictwa Żywnościowego i Środowiska, Uniwersytet w Teramo, Włochy**
- ❖ Data nawiązania współpracy: październik 2022
 - ❖ Charakter współpracy: obecnie trwa zbieranie materiału do wspólnych badań naukowych dotyczących biomonitoringu zwierząt dzikich oraz analizy wpływu narażenia na toksyny środowiskowe na jakość nasienia psów
11. Nazwa ośrodka naukowego: **Katedra Fizjologii Człowieka, Wydział Lekarski, UWM w Olsztynie, Polska**
- ❖ Data nawiązania współpracy: 2017 rok
 - ❖ Charakter współpracy: wspólne badania naukowe dotyczące jelitowego układu nerwowego, wspólny projekt badawczy PRELUDIUM 16 (NCN) w którym jestem kierownikiem projektu a pracownik Katedry, dr Ewa Lepiarczyk jest wykonawcą
 - ❖ Efekty współpracy: 2 publikacje naukowe (*Scientific Reports*, 2021, 11(1):12147, *Nutrients*, 2023, 15, 200)

12. Nazwa ośrodka naukowego: **Zakład Patofizjologii Wydziału Lekarskiego, UWM w Olsztynie, Polska**

- ❖ Data nawiązania współpracy: 2016 rok
- ❖ Charakter współpracy: wspólne badania naukowe dotyczące jelitowego układu nerwowego a także biomonitoringu u ludzi
- ❖ Efekty współpracy: 5 publikacji naukowych (*Journal of Molecular Neuroscience*. 2017, 61:315-324, *Biometals*. 2017, 30:393-403, *Scientific Reports*, 2021, 11(1):23673, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(7):3796, *Medical Science Monitor*, 2022, 28:e936738) prezentacja wyników wspólnej pracy na konferencji międzynarodowej (RegPep 2016 Confrence, 12-14 Jul 2016 Rouen, Francja).

13. Nazwa ośrodka naukowego: **Instytut Oceanografii, Zakład Chemii Morza i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Gdański, Gdynia, Polska**

- ❖ Data nawiązania współpracy: styczeń 2022
- ❖ Charakter współpracy: badania naukowe nad analizą poziomu BPA w mięsie świń
- ❖ Efekty współpracy: publikacja naukowa (*Chemosphere*, 2022, 295:133816).

14. Nazwa ośrodka naukowego: **Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska**

- ❖ Data nawiązania współpracy: luty 2023
- ❖ Charakter współpracy: planowane wspólne badania naukowe metodą LC-MS nad analizą różnych matryc zwierzęcych w ramach badań biomonitoringu zwierząt

5.4 Udział w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych

Wyniki moich badań zostały zaprezentowane na 20 konferencjach naukowych zarówno krajowych jak i międzynarodowych. Konferencje, w których uczestniczyłam czynnie poprzez wystąpienie ustne lub prezentację posteru:

1. XLI Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych (MSKN), Olsztyn, Polska, 15-16.05.2012 – wystąpienie ustne
2. XLIII Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych (MSKN), Olsztyn, Polska, 14.05.2014 – wystąpienie ustne
3. Konferencja Naukowa Sekcji Historii Medycyny Weterynaryjnej PTNW 2015, Olsztyn, Polska „Historia medycyny weterynaryjnej oraz deontologii-wyzwania” 16-17.10.2015 – wystąpienie ustne
4. 34th ESVP and 27th ECVP Conference, 7-10.09.2016 Bolonia, Włochy – prezentacja 2 posterów

5. V Ogólnokrajowa Konferencja Badania I Rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2017-wiosna. Gdańsk 11.05.2017 – [prezentacja posteru](#)
6. VI Ogólnokrajowa Konferencja Badania I Rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2017-jesień. Gdańsk 11.11.2017 – [prezentacja posteru](#)
7. VII Ogólnokrajowa Konferencja Badania I Rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2018-wiosna. Gdańsk 14.05.2018 – [prezentacja posteru](#)
8. History Corner at the 11th FENS Forum of Neuroscience 7-11.07.2018 Berlin, Niemcy – [prezentacja posteru](#)
9. HSCI 2018 16-20.07.2018 Barcelona, Hiszpania – [prezentacja posteru](#)
10. IX Ogólnokrajowa Konferencja Badania I Rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2019-wiosna. Poznań 08.04.2019 – [prezentacja posteru](#)
11. 5th International Scientific Conference of Veterinary Medicine Students 11-12.05.2019 Warszawa, Polska – [prezentacja posteru](#)
12. XVI Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, 26-27.11.2021 (konferencja w trybie hybrydowym) - [wystąpienie ustne online](#)
13. Wykład w ramach spotkania naukowego organizowanego przez PTNW Sekcję Fizjologii I Patologii Psów I Kotów oraz Instytut Medycyny Weterynaryjnej WNBiW UMK w Toruniu (webinar) 24. 06. 2022 – [wystąpienie ustne online](#)
14. IV Symposium BIOMATERIAŁY W MEDYCYNIE I KOSMETOLOGII, 22.02.2023 Toruń, Polska – [wystąpienie ustne](#)

Doniesienia pokonferencyjne opublikowane w czasopismach naukowych:

1. Zalecki M., **Makowska K.**, Czyż W., Marczak M., Kaleczyc J. *The Intrinsic Innervation Of The Cardiac Gland And Pylorus In The European Beaver (Castor Fiber). Journal Of Molecular Neuroscience. Volume 51 , Supplement 1, November 2013; Pages: S162-S163. punktacja MNiSW₂₀₁₃=20, IF₂₀₁₃=2,454*
2. **Makowska K.**, Gonkowski S., Mikolajczyk A., Calka J. *Reaction of Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript-like Immunoreactive (CART-LI) Nerve Fibres in the Wall of the Porcine GallBladder on Lipopolysaccharides from Salmonella enteritidis. Journal of Comparative Pathology. Volume 156, Issue 1, January 2017, Page 132. punktacja MNiSW₂₀₁₇=25, IF₂₀₁₇= 1,249*
3. Gonkowski S., **Makowska K.**, Rytel L., Calka J. *The Influence of Chemically-Induced Inflammation on Nitrergic Nervous Structures Within the Muscular Layer of the Porcine Descending Colon. Journal of Comparative Pathology, January 2017, Page 132. punktacja MNiSW₂₀₁₇=25, IF₂₀₁₇= 1,249*

5.5 Udział w projektach badawczych:

a. Kierownictwo:

1. Grant NCN PRELUDIUM 16 „Porównanie wpływu bisfenolu A (BPA) i bisfenolu S (BPS) na jelitowy układ nerwowy ze szczególnym uwzględnieniem przewodnictwa cholinergicznego na terenie zwoju mięśniowego okrężnicy”. Projekt w ramach współpracy międzynarodowej z Uniwersytetem w Porto (Abel Salazar Biomedical Sciences Institute - University of Porto, Portugal). No. UMO- 2018/31/N/NZ7/01252. Termin realizacji 01.06.2019 – 30.06.2023
2. Dofinansowanie badań z organizacji FENS „The FENS (Federation of European Neuroscience Societies) History Online Project Grants Call 2021”; „The Role Of Women In The Development Of Neuroscience In Poland”, No. 15.670.006-400 (15.03.2022 – 15.03.2024)

b. Wykonawstwo:

1. Grant NCN, PRELUDIUM 15 „Wpływ bisfenolu A na neurony immunoreaktywne wobec neureguliny 1 zlokalizowane w ścianie jelita grubego świni domowej” No. UMO-2018/29/N/NZ7/00183 (1.03.2019 – 29.02.2020)
2. KNOW (Leading National Research Centre) Scientific Consortium "Healthy Animal – Safe Food", "The influence of various doses of acrylamid on immunohistochemical phenotype of neurons in the enteric nervous system, intestinal motility and immunological system of selected segments of the digestive tract" No. UMO-KNOW2017/UWM/ESR3/01/3 (Marzec 2017 – Grudzień 2017)
3. Dofinansowanie badań z organizacji FENS „The FENS (Federation of European Neuroscience Societies) History Online Project Grants Call 2017”; „The pioneers of neuroscience in Poland”, No. 15.670.005 (05.12.2017 – 31.12.2018)
4. Dofinansowanie badań dla doktorantów i młodych naukowców „Śródścienne unerwienie woreczka żółciowego świni” No.15.620.046-300 (Maj 2016 – Maj 2017)
5. Dofinansowanie badań dla doktorantów i młodych naukowców „Neuregulina 1 jako substancja aktywna w jelitowym układzie nerwowym okrężnicy zstępującej świni” No. 15.620.052-300 (Maj 2017 – Maj 2018)
6. Dofinansowanie badań dla doktorantów i młodych naukowców „Określenie wpływu Zearalenonu na struktury nerwowe immunoreaktywne wobec syntazy tlenu azotu (NOS) na terenie jelitowego układu nerwowego dwunastnicy świni domowej.” No. 15.620.065-300 (Maj 2018 – Maj 2019)

5.6 Doświadczenie naukowe zdobyte za granicą

1. Uniwersytet w Lipsku (Universitätsklinikum Leipzig AöR, Medizinische Klinik & Poliklinik III, Liebigstraße 18, 04 103 Leipzig) Staż naukowy 1.06.2016 – 30.06.2016
2. Uniwersytet Zambijski w Lusace (Zambia) Staż naukowy 28.06.2017 – 23.07.2017
3. Uniwersytet w Porto (Abel Salazar Biomedical Sciences Institute - University of Porto, R. Jorge de Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugalia) Staże naukowe – 1–23.10.2018; 25.10 – 25.11.2021; 3–15.07.2022; 3–25.09.2022

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1 Działalność dydaktyczna

- a) 2015 – 2019 – Prowadzenie zajęć z przedmiotu Fizjologia Kliniczna na kierunku weterynaria, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, UWM Olsztyn
- b) Od 2019 – Prowadzenie zajęć z przedmiotu Diagnostyka Kliniczna na kierunku weterynaria, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, UWM Olsztyn
- c) Od 2019 – Prowadzenie zajęć z przedmiotu Diagnostyka Kliniczna w języku angielskim dla studentów z wymiany ERASMUS, kierunek weterynaria, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, UWM Olsztyn
- d) 2022/2023 – Pełnienie funkcji koordynatora przedmiotu „Diagnostyka Kliniczna i Laboratoryjna II”

6.2 Działalność organizacyjna:

- a) Od 2016 – Pełnienie funkcji wykonawcy w 6 projektach badawczych finansowanych z organizacji krajowych i zagranicznych (dokładny opis projektów w podrozdziale 7.3 Udział w projektach badawczych)
- b) 2017-2023 – Recenzowanie prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie międzynarodowych:
 - 2017 - Toxicology Research (IF₂₀₁₇ = 1,890)
 - 2019 - Biomolecules (IF₂₀₁₉ = 3,91)
 - 2019 - Neurogastroenterology and Motility (IF₂₀₁₉ = 2,946)
 - 2020 - Biomolecules (IF₂₀₂₀ = 4,57)
 - 2020 - Toxins (IF₂₀₂₀ = 4,546)
 - 2020 - Toxins (IF₂₀₂₀ = 4,546)

- 2022 - Neurogastroenterology and Motility (IF₂₀₂₂ = 3,960)
 - 2022 - Nutrients (IF₂₀₂₂ = 5,719)
 - 2022 - International Journal of Molecular Sciences (IF₂₀₂₂ = 6,208)
 - 2022 - Journal of Environmental Science and Health, Part B (IF₂₀₂₂ = 2,506)
 - 2023 - Nutrients (IF₂₀₂₂ = 5,719)
- c) Od 2019 – Pełnienie funkcji kierownika w 2 projektach badawczych finansowanych z organizacji krajowych i zagranicznych (dokładny opis projektów w podrozdziale 7.3 Udział w projektach badawczych)
- d) 2022 – Rola promotora pomocniczego (z ang. co-supervisor) w pracy magisterskiej Erasmus+ Master of Science w zakresie zanieczyszczenia środowiska i toksykologii na kierunku Toksykologia Środowiskowa i Zanieczyszczenia – ICBAS/FCUP studenta z wymiany Yoce Aprianto (obrona pracy czerwiec 2022 rok, „Influence of bisphenol A (BPA) and bisphenol S (BPS) on cholinergic neurotransmission in the tripartite synapse of the mouse colon”).
- e) 2022/23 – Członek komitetu organizacyjnego konferencji „Innovative Food of High Quality for Human Health and Sustainability” organizowanej w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki pn. „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” (termin konferencji 7-8.09.2023)
- f) 2022/2023 – Pełnienie roli edytora gościnnego w specjalnym numerze “Health Effects of Bisphenol and Phthalate Exposure” International Journal of Environmental Research and Public Health (140 pkt MEiN)
- g) 2022/2023 – Opieka nad studentem studiów doktoranckich Kainã Rocha Cabrera Fagundes z Uniwersytetu Stanowego w Sao Paulo (Brazylia) odbywającego 10 miesięczny staż (od 1.11.2022 do 30.08.2023) na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.
- h) 2022/2023 – Pełnienie funkcji administratora strony internetowej jednostki organizacyjnej w Katedrze Diagnostyki Klinicznej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, UWM Olsztyn
- i) 2022/2023 – Pełnienie funkcji koordynatora planów zajęć dydaktycznych oraz przygotowywanie materiałów dydaktycznych w języku angielskim dla studentów z programu ERASMUS z przedmiotów realizowanych w Katedrze Diagnostyki Klinicznej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, UWM Olsztyn
- j) Od 2023 – Członek Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych PTNW

6.3 Działalność popularyzująca naukę

- a) 2017 – współautor opublikowanych materiałów dotyczących polskich pionierów neurologii na stronie internetowej Katedry Patofizjologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (adres strony: <http://wl.uwm.edu.pl/kpat/badania-naukowe/pioneers-neuroscience-poland>). Projekt finansowany przez fundację FENS (European History of Neuroscience Online Projects 2017, Federation of European Neuroscience Societies).
- b) 2017 – udzielenie wywiadu dla Radia Olsztyn na temat odbytego stażu naukowego na Uniwersytecie Zambijskim w Lusace, Zambia
- c) 2017 – szkolenie pracowników Uniwersytetu Zambijskiego z zakresu metodyki barwień immunofluorescencyjnych
- d) 2018 – udział w 16. edycji Olsztyńskich Dni Nauki i Sztuki poprzez zaprezentowanie dzieciom fizjologii erytrocytów różnych gatunków zwierząt
- e) 2019 – udzielenie wywiadu w radiu UWM FM w związku z otrzymaniem Stypendium START z Fundacji FNP
- f) 2022/2023 – zachęcanie właścicieli zwierząt do wzięcia udziału w badaniach naukowych dotyczących biomonitoringu psów i kotów poprzez badanie sierści. W tym celu w lecznicach, salonach groomerskich oraz na portalach społecznościowych rozmieszczone zostały plakaty i ulotki informacyjne z informacjami na temat badań i odnośnikami do literatury naukowej
- g) 2023 – wystąpienie w Przedszkolu Samorządowym „Juniorek” w Kieźlinach w celu przedstawienia dzieciom charakterystyki zawodu lekarza weterynarii

7 Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Nagrody i wyróżnienia naukowe:

1. Stypendium START z Fundacji FNP – Roczne stypendia dla wybitnych młodych uczonych na początku kariery naukowej posiadających udokumentowane osiągnięcia w swojej dziedzinie badań. 2019 rok
2. Stypendium Ministra dla wybitnych młodych naukowców 2020-2023 rok
3. Stypendium Ministra za wybitne osiągnięcia w nauce dla doktorantów na rok akademicki 2018/2019

4. Wyróżnienie/nagroda w V edycji konkursu im. Prof. Witolda Bartnika na najlepszą pracę doktorską, magisterską i licencjacką dotyczącą szeroko rozumianej tematyki nieswoistych chorób zapalnych jelit, 2021 rok
5. Nagroda główna w Ogólnopolskim Konkursie Weterynaryjnych Studenckich Kół Naukowych Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych “Śródścienne unerwienie zwieracza odźwiernika żołądka bobra europejskiego (*Castor fiber*)” VIII Edycja, 2013 rok
6. Nagroda I stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych w kategorii „za cykl oryginalnych prac badawczych ogłoszonych w krajowych lub zagranicznych czasopismach z listy JCR, w języku polskim lub obcym (nie stanowiących pracy doktorskiej ani habilitacyjnej)” 2017 rok
7. Nagroda I stopnia Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych W kategorii za pracę doktorską przedstawioną w formie monotematycznego cyklu publikacji lub opublikowaną pracę doktorską przedstawioną w formie monografii w 2020 rok
8. Nagroda Rady Naukowej projektu Regionalna Inicjatywa Doskonałości dla wyróżniających się zespołów badawczych za badania i prace rozwojowe w 2020 r., 2020 rok
9. Nagroda rektora za artykuły naukowe opublikowane w 2019 roku, 2020 rok
10. Nagroda rektora za artykuły naukowe opublikowane w 2020 roku, 2021 rok
11. Nagroda rektora za artykuły naukowe opublikowane w 2021 roku, 2022 rok
12. Stypendium doktoranckie, stypendium rektora dla najlepszych doktorantów oraz stypendium doktoranckie z dotacji projakościowej na I, II, III oraz IV roku studiów doktoranckie

Znajomość języków obcych:

- 1) język angielski: poziom średniozaawansowany (certyfikat TOEIC)
- 2) język niemiecki: poziom podstawowy
- 3) język hiszpański: poziom podstawowy

Odbyte szkolenia:

- 2016 – Szkolenie w zakresie przewidzianym dla osób uczestniczących w procedurach, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Polska
- 2016 – Seminarium Ultrasonograficzne Vetiss, Gdańsk, Polska
- 2017 – Cykl Szkoleń z Zasad Dobrej Praktyki Klinicznej - ICH GCP, Praga, Czechy

- 2017 – Warsztaty ultrasonograficzne doskonalące techniki badania jamy brzusznej, Olsztyn, Polska
- 2019 – Szkolenie w ramach Międzynarodowej Konferencji VetCo „Gorące tematy układu oddechowego psów i kotów”, Warszawa, Polska
- 2023 – kurs stany nagłe poziom I, organizowany przez firmę NEWGRADVETS, kurs prowadzony w formie zdalnej
- 2023 – kurs stany nagłe poziom II, organizowany przez firmę NEWGRADVETS, kurs prowadzony w formie zdalnej

.....
Krystyna Makowska

(podpis wnioskodawcy)