

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Hanna Gorol

Rozprawa doktorska

**Ocena zmian wybranych parametrów cytotoksyczności w nabłonku jelita
środkowego *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) wywołanych
obecnością bisfenolu A**

Promotor:

prof. dr hab. Magdalena Rost-Roszkowska

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Wydział Nauk Przyrodniczych

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Katowice, 2026

Podziękowania

Składam ogromne podziękowania Pani Promotor prof. dr hab. Magdalenie Rost-Roszkowskiej za opiekę merytoryczną, wyrozumiałość, życzliwość, cenne wskazówki oraz wszelką pomoc udzieloną w trakcie realizacji niniejszej pracy.

*Serdecznie dziękuję dr Annie Ostróźce za poświęcony czas, cenne uwagi oraz pomoc w realizacji badań i prowadzeniu hodowli krewetek *Neocaridina davidi*.*

Bardzo dziękuję Pani dr hab. Grażynie Wilczek i Panu dr hab. Sebastianowi Studentowi za współpracę i uczestnictwo w realizacji badań.

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Panu dr Łukaszowi Chajcowi, Pani dr Danucie Urbańskiej-Jasik, Pani Alinie Chachulskiej-Żymelce oraz Panu mgr Szymonowi Jędruszkowi za okazaną pomoc, życzliwość i wsparcie techniczne.

Bardzo dziękuję Panu dr Richardowi Galajdzie za opiekę merytoryczną nad moim stażem zagranicznym na Uniwersytecie Medycyny Weterynaryjnej i Farmacji w Koszycach.

Składam serdeczne podziękowania wszystkim Członkom Zespołu Histologii i Embriologii Zwierząt za życzliwość i tworzenie przyjaznej atmosfery podczas realizacji mojej pracy naukowej.

Bardzo dziękuję Pani dr hab. Izabeli Poprawie oraz Pani dr hab. Weronice Rupik za okazaną pomoc i udzielone wskazówki podczas współprowadzenia zajęć dydaktycznych.

Pragnę złożyć ogromne podziękowania moim koleżankom i kolegom: mgr Aleksandrze Miernik, mgr Dominice Raś, mgr Patrycji Mermer, dr Magdalenie Kowalskiej, dr Pawłowi Kaczmarkowi oraz mgr Dagmarze Knapik za nieocenione wsparcie, poświęcony czas, życzliwość i cenne wskazówki.

W szczególny sposób pragnę podziękować moim Rodzicom, Siostrze i mojemu Partnerowi za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość oraz moim najbliższym Przyjaciołom za zrozumienie, obecność i motywację.

Spis treści

I	STRESZCZENIE	1
II	ABSTRACT.....	3
III	WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	4
IV	AUTOREFERAT ROZPRAWY	5
1.	Wprowadzenie.....	5
1.1	Zanieczyszczenie środowiska bisfenolem A.....	5
1.2	Cytotoksyczność	6
1.2.1	Śmierć komórkowa	6
1.2.2	Stres oksydacyjny	7
1.3	Budowa i charakterystyka jelita środkowego skorupiaków.....	8
1.4	Charakterystyka <i>Neocaridina davidi</i>	9
2.	Cel rozprawy doktorskiej i hipotezy badawcze.....	13
3.	Materiały i metody	15
3.1	Materiał.....	15
3.2	Warunki eksperymentu.....	15
3.3	Metody	17
3.3.1	Mikroskopia świetlna, barwienia histochemiczne i transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) – analiza jakościowa	17
3.3.1.1	Mikroskopia świetlna i barwienia histochemiczne	17
3.3.1.2	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)	17
3.3.2	Mikroskopia konfokalna – analiza jakościowa.....	17
3.3.3	Analiza ilościowa	19
3.3.4	Analiza statystyczna.....	20
4.	Wyniki i dyskusja	21
5.	Wnioski	31
6.	Literatura	33
V	PRACE NAUKOWE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	44
VI	OŚWIADCZENIA AUTORÓW PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	87
VI	DODATKOWE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE.....	100

I STRESZCZENIE

Bisfenol A (BPA) jest organicznym związkiem chemicznym, wykorzystywanym do produkcji tworzyw sztucznych, który jest uważany za ksenobiotyk szkodliwy dla zdrowia człowieka i zwierząt. Pomimo tego, że BPA jest słabo rozpuszczalny w wodzie, jego obecność odnotowano nie tylko w glebie i w powietrzu, ale także w wodach powierzchniowych. Do tej pory szeroko analizowano zmiany liczebności i płodności bezkręgowców słodkowodnych, jednak brakuje badań o podejściu holistycznym z uwzględnieniem różnych poziomów organizacji ciała zwierząt. Z tego powodu do badań wybrano słodkowodnego skorupiaka *Neocaridina davidi*.

Słodkowodna krewetka *N. davidi* pochodzi z Azji i cieszy się dużym zainteresowaniem hodowców i naukowców na całym świecie. Jelito środkowe *N. davidi* składa się z jelita i wątrobotrzustki. Nabłonek jelita ma rurkowaty kształt i charakteryzuje się występowaniem komórek trawiennych (D) oraz embrionalnych/regeneracyjnych komórek E. Wątrobotrzustka jest utworzona przez długie cewki, które można podzielić na strefy: proksymalną, pośrednią i dystalną. Jednowarstwowy nabłonek jelita składa się z komórek embrionalnych/regeneracyjnych (E) oraz z różnicujących się komórek: fibrylarnych/włóknistych (F), resorpcyjnych (R), a także spichrzowych/magazynujących (B).

Osobniki *N. davidi* poddano działaniu BPA w stężeniach: 1, 5, 10mg/l przez 24, 48 i 72 godziny. Wyizolowany materiał w postaci jelita i wątrobotrzustki poddano analizie za pomocą metod jakościowych (mikroskopia świetlna, konfokalna oraz transmisyjna elektronowa) i ilościowych (cytometria przepływowa). Celem badań było zbadanie wybranych parametrów cytotoksyczności wywołanych (lub nie) obecnością BPA w środowisku życia krewetek.

Badania wykazały, że wraz z rosnącym stężeniem BPA oraz czasem ekspozycji na ksenobiotyk zmiany w strukturze organelli w komórkach jelita środkowego nasilają się zarówno w jelicie, jak i w wątrobotrzustce. Ponadto, BPA wywołuje procesy degeneracyjne (apoptozę/nekrozę) komórek i tkanek, przy czym wątrobotrzustka zdaje się być narządem mniej wrażliwym na działanie BPA niż jelito. Udowodniono również, że BPA indukuje autofagię, jako mechanizm ochronny dla tkanek, jednak zmiany te były zależne od rodzaju narządu, stężenia i czasu ekspozycji na ksenobiotyk. Ponadto wykazano, że w ochronie komórek bierze udział również trawienie lipidów. Wykazano również związek między działaniem BPA, a zmianami cyklu komórkowego i poziomem proliferacji komórek macierzystych jelita środkowego.

Bisfenol A wywołuje również zmiany w potencjale błonowym mitochondriów, w syntezie ROS i aktywności systemu antyoksydacyjnego.

Wyniki badań zostały opublikowane w dwóch oryginalnych pracach (Gorol i in. 2025, Gorol i in. 2026).

II ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is an organic chemical compound used in the production of plastics that is considered a xenobiotic harmful to human and animal health. Although BPA is poorly soluble in water, its presence has been reported not only in soil and air, but also in surface waters. So far, changes in the population size and fertility of freshwater invertebrates have been widely analyzed, but there is a lack of studies with a holistic approach taking into account different levels of animal body organization. For this reason, the freshwater crustacean *Neocaridina davidi* was chosen for the study.

The freshwater shrimp *N. davidi* originates from Asia and is of great interest to breeders and scientists worldwide. The *N. davidi* midgut consists of the intestine and the hepatopancreas. The intestinal epithelium is a tube-shaped organ characterized by the presence of digestive cells (D) and embryonic/regenerative cells (E). The hepatopancreas is formed by long tubules that can be divided into proximal, medial, and distal zones. Its single-layer epithelium consists of embryonic/regenerative cells (E) and differentiating cells: fibrillar (F), resorptive (R), and storage cells (B).

N. davidi individuals were exposed to BPA at concentrations of 1, 5, 10mg/l for 24, 48, and 72 hours. The isolated material consisting of intestine and hepatopancreas was analyzed using qualitative (light, confocal, and transmission electron microscopy) and quantitative (flow cytometry) methods. The aim of the study was to investigate selected cytotoxicity parameters induced (or not) by the presence of BPA in the living environment of shrimp.

Studies have shown that with increasing BPA concentration and time of exposure to the xenobiotic, changes in the structure of organelles in the cells of the midgut intensify both in the intestine and in the hepatopancreas. Moreover, BPA induces degenerative processes (apoptosis/necrosis) in cells and tissues, with the hepatopancreas appearing less sensitive to BPA than the intestine. BPA has also been shown to induce autophagy as a tissue-protective mechanism, but these changes depend on the type of organ, the concentration, and the time of exposure to the xenobiotic. Furthermore, lipid digestion has been shown to play a role in cell protection. A relationship between BPA action and changes in the cell cycle and the proliferation of midgut stem cells has also been demonstrated. Bisphenol A also causes changes in the mitochondrial membrane potential, ROS synthesis, and antioxidant system activity.

The research results were published in two original manuscripts (Gorol et al. 2025, Gorol et al. 2026).

III WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU STANOWIĄCEGO PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. **Gorol H.**, Ostróżka A., Wilczek G., Chajec Ł., Student S., Aleksa A., & Rost-Roszkowska M. 2025. How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 92(1), 390–409. DOI: 10.1080/24750263.2025.2463421

IF: 1,4 MNiSW: 140pkt

2. **Gorol H.**, Chajec Ł., Wilczek G., Student S., Ostróżka A., Rost-Roszkowska M. 2026. Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 93:1, 563-582. DOI: 10.1080/24750263.2026.2652113

IF: 1,4 MNiSW: 140pkt

Łączna suma IF = 2,8

Łączna suma punktów MNiSW = 280

IV AUTOREFERAT ROZPRAWY

1. Wprowadzenie

1.1 Zanieczyszczenie środowiska bisfenolem A

Zanieczyszczenie środowiska stanowi poważny problem ekologiczny i jak dotąd zidentyfikowano wiele zmian pojawiających się na różnych poziomach organizacji ciała zwierząt na skutek działania stresorów takich jak związki chemiczne wykorzystywane do produkcji tworzyw sztucznych. Bisfenol A (BPA) to organiczny związek chemiczny, należący do pochodnych fenoli. Istnieje wiele doniesień, że związek ten może być przyczyną licznych chorób metabolicznych oraz stanowi zanieczyszczenie środowiska (Gross 2007, Canesi i Fabbri 2015). Bisfenol A należy do antropogenicznych źródeł zanieczyszczenia, ponieważ jego występowanie w środowisku jest wynikiem działalności człowieka (Gonkowski i Makowska 2022). BPA jest najbardziej znanym i najlepiej przebadanym związkiem chemicznym należącym do grupy bisfenoli (Jurek i Leitner 2018). Do jego głównych zastosowań w procesach przemysłowych należy produkcja: żywic epoksydowych, tworzyw poliwęglanowych, wyrobów papierniczych, wyrobów medycznych, a także opakowań na żywność, w związku z tym jest obecny w przedmiotach codziennego użytku (Björnsdotter i in. 2017, Neri i in. 2024) (**Fig. 1**).



Fig. 1 Przykładowe produkty codziennego użytku zawierające w swym składzie BPA
(Muhamad i in. 2016).

BPA wykryto w glebie, wodzie i powietrzu, a jego powszechne i szerokie zastosowanie w procesach produkcyjnych prowadzi do jego kumulacji zarówno w środowisku, jak i w organizmach żywych (Corrales i in. 2015, Careghini i in. 2015). Małe organizmy wodne, będąc jednymi z ogniw w łańcuchu troficznym, stanowią pożywienie dla innych zwierząt. W konsekwencji, bisfenol A znajdujący się w wodach może zostać przeniesiony do ich organizmu, a następnie może wykazywać transfer troficzny (Lee i in. 2015, Li i in. 2021). BPA może też gromadzić się w różnych narządach małych organizmów wodnych, wywołując ostatecznie liczne zmiany kancerogenne lub mutagenne (Corrales i in. 2015, Li i in. 2018).

1.2 Cytotoksyczność

Mianem cytotoksyczności określa się niszczenie żywych komórek za pośrednictwem szkodliwych substancji chemicznych lub komórek mediatorowych. Pod wpływem działania związku cytotoksycznego na komórki, może dochodzić do aktywacji licznych procesów, które to wskazywać będą na siłę działania stresora, a więc siłę cytotoksyczności. Tak więc spośród parametrów cytotoksyczności wymienić można: uszkodzenia organelli komórkowych (np. jądro komórkowe, mitochondria), aktywację śmierci komórkowej (apoptozy/nekrozy), aktywację autofagii, proliferację komórek, wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (ROS), aktywację enzymów antyoksydacyjnych i inne (Çelik 2018).

1.2.1 Śmierć komórkowa

Wymiana komórek jest naturalnym procesem, który polega na równowadze pomiędzy liczbą nowych komórek a liczbą komórek usuwanych z organizmu (D'Arcy i in. 2019). Genetycznie zaprogramowana śmierć komórki jest uważana za ważny aspekt homeostazy organizmów wielokomórkowych. Wyróżniamy wiele rodzajów śmierci komórkowej. Apoptoza to nielityczny rodzaj śmierci, z kolei nekroza jest litycznym rodzajem śmierci komórki, który w przeciwieństwie do apoptozy prowadzi do rozwoju stanu zapalnego (Newton i in. 2024).

Badania wykazały, że apoptoza, autofagia i nekroza mogą być regulowane przez podobne szlaki i mogą dzielić cząsteczki inicjujące i efektorowe. Apoptoza jest uważana za główny mechanizm regulowanej śmierci komórkowej i jest ważnym elementem takich procesów jak: uszkodzenie lub stres komórkowy, ale także morfogeneza i rozwój. Zarówno bodźce zewnętrzne, jak i wewnętrzne mogą wywołać apoptozę (Nikoletopoulou i in. 2013). Do cech morfologicznych apoptozy należą: kurczenie cytoplazmy, kondensacja jądra komórkowego i fragmentacja jądra, a w rezultacie fragmentacja całej komórki. Za tymi procesami stoją mechanizmy molekularne, m.in. permeabilizacja błony mitochondrialnej, kondensacja chromatyny i fragmentacja DNA wywoływane aktywacją kaspaz, czyli proteaz cysteinowych

uczestniczących we wszystkich szlakach apoptotycznych (Nikoletopoulou i in. 2013, Newton i in. 2024).

Do morfologicznych cech komórek nekrotycznych należy: pęcznienie organelli, pęknięcie błony komórkowej, wakuolizacja cytoplazmy i liza całej komórki. Dawniej uważano, że nekroza nie jest procesem prowadzącym do naturalnego obumierania komórek, jednakże badania dowiodły istnienia także nekroptozy, czyli zaprogramowanej formy nekrozy (Nikoletopoulou i in. 2013).

Procesem, który także może prowadzić do śmierci komórkowej jest makroautofagia, zwana również autofagią. W trakcie tego procesu dochodzi do tworzenia autofagosomów, czyli otoczonych podwójną błoną pęcherzyków, które gromadzą cytoplazmę z uszkodzonymi organellami czy substancjami toksycznymi, które mają ulec neutralizacji. Autofagosomy łączą się z lizosomami, tworząc autolizosomy, w których zawartość ulega degradacji pod wpływem kwaśnych hydrolaz. Produkty trawienia mogą następnie posłużyć do wytworzenia nowych struktur albo być wykorzystane jako źródło energii (D'Arcy i in. 2019, Nikoletopoulou i in. 2013). Autofagia może być inicjowana przez czynniki stresogenne (Mizushima i in. 2008). Zatem proces ten będzie początkowo umożliwiał komórkom przetrwanie, jednak w przypadku dużej siły stresora lub jego długotrwałego działania będzie uruchamiał apoptozę lub nekrozę (Klionsky i in. 2016, 2021).

1.2.2 Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny jest brakiem równowagi między produkcją reaktywnych form tlenu (ROS), a ich rozkładem, czyli między mechanizmami oksydacyjnymi i antyoksydacyjnymi (Candas i Li 2014, Gao 2025). ROS są toksycznymi produktami ubocznymi metabolizmu komórkowego, a należą do nich między innymi wolne rodniki i liczne nadtlutki. ROS są jednymi z czynników apoptotycznych, ponieważ wywołują stres oksydacyjny (Sinha i in. 2013, Kamogashira i in. 2015, Gao 2025).

Upośledzenie funkcji mitochondriów i zmiany w ich ultrastrukturze prowadzą do zaburzeń funkcjonowania układu enzymatycznego przez akumulację ROS, ponieważ dochodzi do zaburzeń produkcji wody w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i produkcji $O_2^{\cdot-}$, przekształcającego się w $\cdot OH$ i H_2O_2 , co prowadzi do zmian potencjału błony mitochondrialnej (Koizumi i in. 1994, Cannino i in. 2009, Włodarczyk i in. 2019b, Rost-Roszkowska i in. 2021a, Gao 2025). Te mechanizmy prowadzą do zaburzeń funkcji białek, lipidów i DNA, ale także do aktywacji enzymów antyoksydacyjnych (Yao i in. 2007, Ramalho-Santos i in. 2009, Włodarczyk i in. 2019b, Rost-Roszkowska i in. 2021a, Viebahn-Haensler i León Fernández

2024). Niewielkie ilości ROS są neutralizowane przez przeciwutleniacze, a stres oksydacyjny definiujemy jako produkcję ROS przekraczającą zdolność i siłę przeciwutleniaczy (Li i in. 2013, Aaser 2024). Przeciwutleniacze wpływają na stężenie ROS, co prowadzi do poprawy funkcjonowania mitochondriów i jądra komórkowego, dzięki czemu można chronić DNA, czy liczne białka cytoplazmatyczne przed uszkodzeniami (Chelikani i in. 2004, Luberda 2005, Combelles i in. 2009). Układ antyoksydacyjny dzielimy na enzymatyczny oraz nieenzymatyczny (Gao 2025). Do układu antyoksydacyjnego należą np.: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), przekształcająca ponadtlenek w nadtlenek wodoru i tlen (Combelles 2009, Napolitano i in. 2021), zredukowana forma glutationu (GSH) (Luberda 2005, Combelles i in. 2009) oraz katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa, które przekształcają nadtlenek wodoru w wodę i tlen (Brigelius-Flohé 1999, Chelikani i in. 2004, Combelles i in. 2009, Napolitano i in. 2021). Dzięki temu systemowi uszkodzone organelle komórkowe mogą być chronione lub ulegać regeneracji. I tak np. GSH (γ -glutamylo-cysteinylo-glicyna) jest jednym z przeciwutleniaczy biorących udział w regulacji przepuszczalności błony mitochondrialnej. Występuje w różnych organellach i strukturach komórkowych, w tym w mitochondriach (Ribas i in. 2014). GSH może reagować z licznymi wolnymi rodnikami, co prowadzi do redukcji nadtlenu hydroksylowego. Może także wzmacniać aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych, umożliwiając w ten sposób aktywację mechanizmów antyoksydacyjnych. W ten sposób GSH stanowi barierę ochronną dla mitochondriów, zapobiegając ich degeneracji lub inaktywacji (Marí i in. 2020, Dawood i in. 2022).

1.3 Budowa i charakterystyka jelita środkowego skorupiaków

Układ pokarmowy bezkręgowców jest uważany za jedną z pierwszych barier (obok pokrycia ciała) przed wpływem na organizm czynników stresogennych pochodzących ze środowiska zewnętrznego (Rost-Roszkowska i in. 2010). Przewód pokarmowy skorupiaków składa się z jelita przedniego, środkowego oraz tylnego. Jelito środkowe jest właśnie tym odcinkiem, który mając bezpośredni kontakt z substancjami toksycznymi zawartymi w pokarmie lub wodzie, bierze udział w utrzymaniu homeostazy organizmu (Malagoli i in. 2010, Rost-Roszkowska i in. 2021b, 2022). Jelito środkowe ma pochodzenie endodermalne i nie jest pokryte kutikulą, w przeciwieństwie do jelita przedniego i tylnego o pochodzeniu ektodermalnym. U skorupiaków jelito środkowe może składać się z rurowatego jelita oraz wątrobotrzustki, która jest gruczołem trawiennym lub z samej wątrobotrzustki (Coleman 1990, Herrera-Alvarez i in. 2000, Sousa i Petriella 2006, Symonova 2007, Roszt-Roszkowska i in. 2012), a u Malacostraca składa się z jelita i wątrobotrzustki (Sousa i Petriella 2001, Symonova

2007). Jelito środkowe skorupiaków, a konkretnie nabłonek go wyściełający, składa się z kilku rodzajów komórek, których funkcje opisano w tabeli (**Tab.1**), sporządzonej na podstawie pracy Sonakowskiej i in. 2015. U niektórych skorupiaków w jelicie środkowym mogą występować tylko komórki trawienne (Rost-Roszkowska i in. 2012). Funkcjonalnie jelito środkowe skorupiaków odpowiada za syntezę i wydzielanie enzymów, hormonów, a także za trawienie wewnątrzkomórkowe, wchłanianie i magazynowanie (Sonakowska i in. 2015).

Rodzaj komórki	Funkcje
E (embrionalne/regeneracyjne)	Komórki macierzyste jelita, podziały komórkowe, regeneracja
R (resorpcyjne)	Detoksykacja, recykling, dostarczanie energii
F (fibrylarne)	Synteza i wydzielanie enzymów
M	Gromadzenie lipidów i polisacharydów
B	Trawienie wewnątrzkomórkowe, gromadzenie substancji, wydzielanie

Tabela 1 Rodzaje komórek w układzie pokarmowym skorupiaków (Sonakowska i in. 2015).

1.4 Charakterystyka *Neocaridina davidi*

Jako obiekt badań wybrano jednego ze słodkowodnych gatunków skorupiaków – słodkowodną krewetkę *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). Dokładną przynależność systematyczną gatunku przedstawiono w **Tabeli 2**. *N. davidi* występuje w wielu odmianach kolorystycznych, jednak najpopularniejszą jej odmianą jest *Red cherry* (**Fig. 2**). Osobniki dorosłe osiągają rozmiary do 3 cm. Z jaj wykluwają się larwy, które po około 2-3 miesiącach osiągają dojrzałość płciową. Cykl życiowy gatunku charakteryzuje się tym, że larwy pelagiczne mogą całkowicie różnić się morfologią i zwyczajami od osobników dorosłych (Anger 2001, Pantaleño i in. 2015). Tak więc wyróżnić można stadia larwalne: zoea I, zoea II i zoea III, które różnią się siedliskami żerowania: zoea I nie żeruje i jest lecytotroficzna, podczas gdy zoea II i III żerują na materiale roślinnym i szczątkach zwierzęcych. Dorosłe osobniki tego gatunku należą do organizmów wszystkożernych, żywiąc się detrytusem, czy glonami (Sonakowska-Czajka i in. 2021).



Fig. 2 Krewetka *Neocaridina davidi* [opracownie własne].

Gatunek ten charakteryzuje się prostą budową ciała, dużą płodnością i plennością, a także łatwością hodowli, w związku z czym cieszy się wysokim zainteresowaniem wśród hodowców i akwarystów na całym świecie oraz zainteresowaniem naukowców (Sonakowska i in. 2015, Sonakowska-Czajka i in. 2021, Włodarczyk i in. 2017, 2019a, 2019b, Ostróżka i in. 2022, 2024, 2025). Ta pochodząca z Azji krewetka została wykryta również w rzekach europejskich takich jak Odra (Jabłońska i in. 2018). Podobnie jak inne skorupiaki, *N. davidi* odgrywa kluczową rolę w ekosystemie wodnym (Weber i Traunspurger 2016), a zatem stanowi przedmiot zainteresowania badań toksykologicznych (Tropea i in. 2015, Pantaleão i in. 2015, Włodarczyk i in. 2017, Włodarczyk i in. 2019a, 2019b, Ostróżka i in. 2022, 2024).

Typ	Arthropoda
Podtyp	Crustacea
Gromada	Malacostraca
Rząd	Decapoda
Rodzina	Atyidae
Rodzaj	Neocaridina
Gatunek	Neocaridina davidi

Tabela 2 Przynależność systematyczna *N. davidi*.

Jelito środkowe *N. davidi* jest najdłuższym odcinkiem przewodu pokarmowego, składa się z jelita oraz wątrobotrzustki. Nabłonek jelita *N. davidi* jest nabłonkiem walcowatym, leżącym na blaszce podstawnej i składa się z dwóch rodzajów komórek: trawiennych (D) oraz embrionalnych/regeneracyjnych (E), przy czym komórki regeneracyjne są rozmieszczone tylko w części przedniej tego odcinka układu pokarmowego. Charakterystycznymi cechami komórek E są: owalny kształt, duże, owalne jądro komórkowe oraz brak pofałdowania błony podstawnej. Komórki D mają charakterystyczną regionalizację cytoplazmy, dzięki czemu możemy wyróżnić regiony: podstawny (bazalny), okołojądrowy (perinuklearny) i szczytowy (apikalny). Komórki trawienne charakteryzuje walcowany kształt, silnie pofałdowana błona podstawna oraz kontakt ze światłem jelita. Cytoplazma bazalna jest bogata w mitochondria, cysterny siateczki śródplazmatycznej szorstkiej (RER) i gładkiej (SER), a także kompleksy aparatu Golgiego. Cytoplazma okołojądrowa ma podobną budowę, jednak z mniejszą liczbą mitochondriów. Charakterystyczną cechą regionu apikalnego jest występowanie długich mikrokosmków oraz licznych mitochondriów, cystern RER i SER. Mogą w niej również występować autofagosomy, ciała wielopęcherzykowe i pęcherzyki o różnej gęstości elektronowej (Sonakowska i in. 2015).

Wątrobotrzustka także wyścielona nabłonkiem jednowarstwowym, jest utworzona przez długie cewki, w których można wyróżnić trzy regiony: strefę proksymalną, środkową (pośrednią) i dystalną. W strefie dystalnej można znaleźć komórki embrionalne/regeneracyjne (E), a w strefie pośredniej oprócz komórek E, znajdują się także komórki różniące się. W strefie proksymalnej rozmieszczone są komórki zróżnicowane: fibrylarne/włókniste (F), resorpcyjne (R) oraz spichrzowe/magazynujące (B). Charakterystyczną cechą komórek B są duże kule materiału zapasowego, a cytoplazma jest bogata w wolne rybosomy, wakuole, mitochondria, z kolei cysterny RER i SER występują w niewielkich ilościach (Sonakowska i

in. 2015, Sonakowska-Czajka i in. 2021, Ostróżka i in. 2022). Cytoplazma komórek R jest bogata w cysterny RER, SER, aparaty Golgiego, mitochondria, pęcherzyki o średniej gęstości elektronowej oraz autofagosomy. Cytoplazma komórek F jest pozbawiona materiałów zapasowych, jest jednak bogata w cysterny RER, SER i cysterny aparatu Golgiego, których rozmieszczenie i struktura nadaje im komórkom wygląd fibrylarny (Sonakowska i in. 2015).

2. Cel rozprawy doktorskiej i hipotezy badawcze

W literaturze znaleźć można dane na temat wpływu bisfenolu A na narządy zwierząt, jednakże analizowane były jedynie wybrane aspekty histologii, cytologii, fizjologii oraz ekologii (Canesi i Fabbri 2015, Crain i in. 2007). Brakuje w literaturze holistycznego omówienia wpływu bisfenolu A na różne poziomy organizacji ciała, czyli na narządy, tkanki, komórki, organelle i ich błony, aż po zmiany na poziomie molekularnym. Różne czynniki stresowe wyzwalają procesy śmierci komórkowej, które mogą działać jako mechanizm przetrwania komórek i tkanek (Franzetti i in. 2012, Bednarska i Świątek 2016, Rost-Roszkowska i in. 2022, Ostróżka i in. 2024). W celu lepszego zrozumienia potencjalnych skutków wpływu bisfenolu A na funkcjonowanie organizmów należy przedstawić wszystkie zmiany, które zachodzą na różnych poziomach organizmów żywych.

Głównym celem niniejszych badań było zanalizowanie u dorosłych osobników *N. davidi* wybranych parametrów cytotoksyczności, a więc takich, które są aktywowane w organizmie na skutek ekspozycji zwierząt na działanie szkodliwego BPA. Szczegółowe cele rozprawy doktorskiej to:

- (1) opisanie na poziomie ultrastrukturalnym zmian w komórkach nabłonka jelita środkowego *N. davidi*, pojawiających się w wyniku ekspozycji organizmu na działanie BPA;
- (2) opisanie zależności pomiędzy autofagią i apoptozą/nekrozą, uruchamianych w komórkach nabłonka jelita środkowego na skutek ekspozycji *N. davidi* na działanie BPA;
- (3) zanalizowanie zależności między ilością materiałów zapasowych a procesem autofagii, pojawiających się w wyniku ekspozycji zwierząt na BPA;
- (4) zbadanie zależności pomiędzy zmianami w mitochondriach i jądrach komórkowych a poziomem ROS i wybranych substancji antyoksydacyjnych w komórkach nabłonka jelita środkowego pod wpływem działania BPA;
- (5) opisanie zależności pomiędzy pojawiającymi się zmianami wybranych parametrów cytotoksyczności a stężeniem BPA w środowisku oraz czasem ekspozycji zwierząt na ten związek.

Hipotezy badawcze, które były w wyniku badań weryfikowane to:

- **H1:** ekspozycja organizmu na działanie BPA wywołuje zmiany w strukturze organelli w komórkach nabłonka jelita środkowego;
- **H2:** ekspozycja organizmu na działanie BPA wywołuje degenerację (apoptozę/nekrozę) komórek i tkanek;
- **H3:** ekspozycja na działanie BPA aktywuje autofagię w komórkach jelita jako mechanizmu ochrony tkanek, ponieważ zbyt duża liczba organelli ulega uszkodzeniu pod wpływem jego działania;
- **H4:** Ekspozycja zwierząt na BPA wywołuje zmiany w ilości materiałów zapasowych, co koreluje ze zmianami intensywności autofagii;
- **H5:** BPA w środowisku wpływa na zmiany cyklu komórkowego oraz proliferację komórek jelita środkowego;
- **H6:** BPA w środowisku wywołuje zmiany w potencjale błonowym mitochondriów, uszkodzenia DNA, zmiany w syntezie ROS oraz aktywności systemu antyoksydacyjnego, ponieważ BPA powoduje uszkodzenie mitochondriów;
- **H7:** istnieje wyraźna zależność pomiędzy zmianami pojawiającymi się na terenie komórek, organelli, stężeniem ROS i enzymów antyoksydacyjnych na skutek ekspozycji organizmu na działanie BPA;
- **H8:** w obu narządach tworzących jelito środkowe, pod wpływem BPA w środowisku, aktywowane są takie same procesy cytotoksyczne, a ich intensywność zależna jest od czasu ekspozycji zwierząt oraz stężenia BPA.

3. Materiały i metody

3.1 Material

Materiał stanowiły dorosłe samce i samice słodkowodnej krewetki *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). Wcześniejsze badania nad tym gatunkiem nie wykazały istotnych różnic między samcami i samicami podczas narażenia zwierząt na różne czynniki stresowe (Włodarczyk i in. 2017, 2019a, 2019b, Ostróżka i in. 2022, 2024, 2025). Do analizy i porównania zmian na różnych poziomach organizacji ciała zwierząt wybrane zostały dwa odcinki jelita środkowego: jelito oraz wątrobotrzustka. Krewetki karmiono *ad libitum* karmą JBL Novo Prawn (Sonakowska i in. 2015, 2016, Włodarczyk i in. 2017, 2019a, 2019b, Ostróżka i in. 2024). Zwierzęta hodowano w akwarium o pojemności 105 l w stałych warunkach, z filtracją mechaniczną, grzałką termostatyczną oraz napowietrzeniem. Starano się stworzyć warunki, które odpowiadają naturalnemu środowisku zwierząt, temperatura wody wynosiła 21 °C, pH = 7, a twardość wody (GH) = 10. Hodowla ta była prowadzona w sposób ciągły przez cały okres trwania eksperymentu.

3.2 Warunki eksperymentu

Odpowiednie stężenia i czas trwania ekspozycji na BPA dla każdej z grup badawczych dobrano na podstawie artykułów opisujących podobne eksperymenty, które były przeprowadzane na skorupiakach słodkowodnych (Castritsi-Catharios i in. 2013, Gerhardt 2019, Lee i in. 2003, González-Olalla i in. 2024, Liang i in. 2024). Bisfenol A jest wykrywany w wysokich stężeniach w odciekach ze składowisk odpadów w stężeniach aż do 10 mg/l (Yamamoto i in. 2001, Lee i in. 2003, Fabrello i Matozzo 2022). Zwierzęta podzielono na grupy eksperymentalne i poddano działaniu trzech stężeń BPA (1, 5 i 10 mg/l) przez 24, 48 i 72 godziny. Oddzielnie analizowano jelito (CIn) i wątrobotrzustkę (CH). Odpowiednie stężenia uzyskano dzięki zastosowaniu sonikatora do rozpuszczenia bisfenolu A w wodzie akwariowej. Krewetki z grup badawczych trzymano pojedynczo w pojemnikach o pojemności 0,5 litra, aby wyeliminować wpływ konkurencji między osobnikami. Utrzymywano stałe warunki i parametry wody: temperaturę wody ustawiono na 21 °C, pH = 7, a twardość wody (GH) = 10. Osobniki karmiono *ad libitum* karmą JBL Novo Prawn. Odchody usuwano z dna co 12 godzin. Grupę kontrolną stanowiły osobniki z hodowli ciągłej w wodzie akwariowej bez dodatku BPA. Grupy kontrolne i doświadczalne hodowano w sposób ciągły, ale dla każdego osobnika przygotowywano świeżą wodę za każdym razem. Z każdej grupy badawczej wybierano po pięć osobników do wykonania każdej z opisanych poniżej metod (n = 5). Przed wykonaniem sekcji i wyizolowaniem jelita i wątrobotrzustki, zwierzęta znieczulano chloroformem lub CO₂. Zatem

dorośle osobniki *N. davidi* były podzielone na następujące grupy eksperymentalne: (Tab. 3, Fig. 3).

Stężenie BPA/ czas ekspozycji	Jelito			Wątrobotrzustka		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
0mg/L	CIn			CH		
1mg/L	1In24	1In48	1In72	1H24	1H48	1H72
5mg/L	5In24	5In48	5In72	5H24	5H48	5H72
10mg/L	10In24	10In48	10In72	10H24	10H48	10H72

Tabela 3 Grupy eksperymentalne. In – jelito, H – wątrobotrzustka, 24, 48 i 72 – oznaczają liczbę godzin eksperymentu.

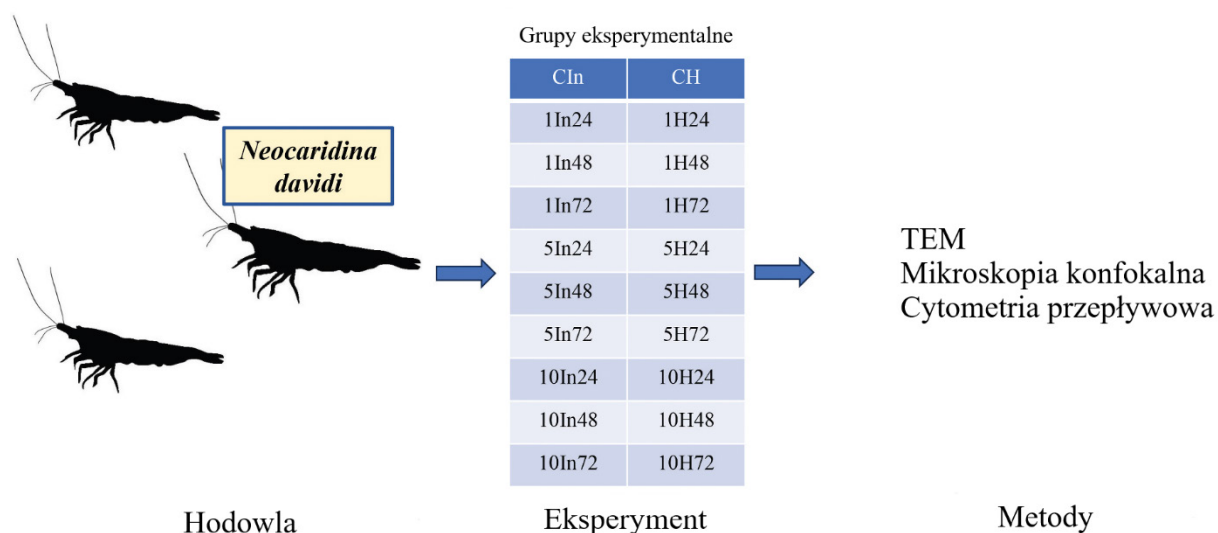


Fig. 3. Schemat eksperymentu (Gorol i in. 2026, zmodyfikowane).

3.3 Metody

3.3.1 Mikroskopia świetlna, barwienia histochemiczne i transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) – analiza jakościowa

3.3.1.1 Mikroskopia świetlna i barwienia histochemiczne

Wyizolowane narządy utrwalono w 2,5% glutaraldehydzie i 1% tetratlenku osmu w 0,1 M buforze fosforanowym (2 godz., 4 °C) i przygotowano zgodnie z protokołem (Sonakowska i in. 2015, Sonakowska-Czajka i in. 2021). Materiał zatopiony w żywicy epoksydowej krojono za pomocą mikrotomu Leica Ultracut UCT25. Uzyskane półcienkie skrawki (o grubości 0,8 µm) barwiono 1% błękitem metylenowym w 0,5% boraksie (w celu uwidocznienia topografii tkanki). Półcienkie skrawki barwiono odczynnikami Schiffa (barwienie polisacharydów) i błękitem bromofenolowym (BPB, barwienie białek) zgodnie z protokołem opisanym dla *N. davidi* (Sonakowska i in. 2015, Ostróżka i in. 2022) i analizowano przy użyciu mikroskopu świetlnego OLYMPUS BX60.

3.3.1.2 Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Jelito i wątrobotrzustkę z wszystkich grup eksperymentalnych utrwalono w 2,5% glutaraldehydzie i 1% tetratlenku osmu w 0,1 M buforze fosforanowym (2 godz., 4 °C) i odpowiednio przygotowano zgodnie z protokołem opisanym w poprzednich pracach (Rost-Roszkowska i in. 2020a, 2020b, 2022). Narządy utrwalono, przemyto, odwodniono i zatopiono w żywicy epoksydowej (Epoxy Embedding Medium Kit; Sigma). Następnie skrawki ultracienkie (70 nm) krojono na ultramikrotomie Leica Ultracut EM UC7 RT oraz przeniesiono na siatki miedziane i kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu (Sonakowska i in. 2015, 2016, Rost-Roszkowska i in. 2020a, 2020b, Poprawa i in. 2022). Materiał analizowano za pomocą mikroskopów elektronowych Hitachi H500 i Quanta FEG250.

3.3.2 Mikroskopia konfokalna – analiza jakościowa

3.3.2.1 LysoTracker Red - znakowanie organelli o silnie kwaśnym pH

LysoTracker Red służy do wykrywania silnie kwaśnych organelli takich jak lizosomy oraz autolizosomy. Wyizolowane narządy inkubowano (bez utrwalania) w 2,5 mmol/l LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, L 7528; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) i 1 µg/ml DAPI (Sigma-Aldrich), zgodnie z protokołem (Poprawa i in. 2022). Do obserwacji wykorzystano mikroskop konfokalny Olympus FluoView FV1000, z laserami 559 nm dla LysoTracker Red i 405 nm dla barwnika DAPI. W efekcie można zaobserwować

niebieską fluorescencję uwidaczniającą jądra komórkowe oraz czerwoną fluorescencję silnie kwaśnych struktur.

3.3.2.2 BODIPY – wykrywanie lipidów

Wyizolowane narządy – jelito oraz wątrobotrzustkę barwiono bez utrwalenia roztworem roboczym BODIPY o stężeniu 20 $\mu\text{l/ml}$ (30 min, RT, w ciemności) przygotowanym z roztworu wyjściowego BODIPY zgodnie z protokołem producenta (Molecular Probes). Następnie materiał przemyto za pomocą TBS oraz barwiono roztworem DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$, 30 min, RT, w ciemności). Do obserwacji wykorzystano mikroskop konfokalny Olympus FluoView FV1000 oraz lasery argonowe: 405 nm (detekcja DAPI) i 559 nm. Następnie obserwowano niebieską fluorescencję jąder komórkowych i zieloną fluorescencję lipidów (Rost-Roszkowska i in. 2024).

3.3.2.3 JC1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylo-benzimidazolylo-karbocyjaniny jodku) - wykrywanie zmian potencjału transblonowego mitochondriów (ΔCm)

JC-1 różnicuje komórki o wysokim potencjale mitochondrialnym (pomarańczowa/czerwona fluorescencja - spolaryzowane mitochondria) i niskim potencjale mitochondrialnym (zielona fluorescencja – zdepolaryzowane mitochondria) (Salvioli i in. 1997). Wyizolowane narządy inkubowano w ciemności bez utrwalenia z 5 μl 1,5 mM roztworu JC-1 w DMSO (99,97%, $\text{H}_2\text{O} < 0,1\%$) przez 15 minut w temperaturze pokojowej (RT). Następnie barwiono DAPI (30 minut, RT, ciemność). Materiał przemyto za pomocą TBS. Do obserwacji wykorzystano mikroskop konfokalny Olympus FluoView FV3000. Sygnały rejestrowano w zakresie 405 nm dla DAPI oraz 500–600 nm i 570–670 nm dla JC-1.

3.3.2.4 ThiolTracker Violet - wykrywanie poziomu zredukowanego glutationu (GSH) w komórkach

GSH jest przeciwutleniaczem służącym do detoksykacji komórkowej. Wyizolowane narządy barwiono odczynnikiem ThiolTracker Violet (10 μM) zgodnie z protokołem producenta ([chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/mp10095.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/mp10095.pdf)) i DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$, 30 min, RT, w ciemności). Materiał przemyto PBS i obserwowano za pomocą konfokalnego mikroskopu skaningowego Olympus FluoView FV3000. Sygnały rejestrowano w zakresie 405 nm dla DAPI i 430-470 nm dla ThiolTracker Violet.

3.3.3 Analiza ilościowa

Narządy wyizolowano i przygotowano homogenaty w PBS (buforowanym roztworze soli fizjologicznej) (pH 7,4) przy użyciu homogenizatora mechanicznego (BEAD BUG MICROTUBE HOMOGENIZER) w celu przygotowania zawiesiny komórek, którą następnie przemywano i wirowano z prędkością 1500 obr./min przez 5 minut, a osad zawieszano w 100 µl PBS (Rost-Roszkowska i in. 2020b).

3.3.3.1 Zestaw MUSE Cell Cycle (Cytek MCH100106)

Zestaw odczynników wykorzystywany jest w analizie ilościowej komórek będących w różnych fazach cyklu komórkowego (G0/G1, S, G2/M). Materiał przygotowano do analizy zgodnie z protokołem producenta: <https://www.luminexcorp.com/muse-cell-cycle-kit/#overview>. Utrwalono w 70% etanolu (24 godz., na lodzie), następnie przemyto w buforze PBS, inkubowano w odczynniku Muse Cell Cycle (30 minut, RT, w ciemności). Analizę przeprowadzono za pomocą cytometru MUSE.

3.3.3.2 Zestaw MUSE Ki67 Proliferation Kit (Cytek MCH100114)

Muse Ki67 Proliferation Kit służy do pomiarów ilościowych odsetka komórek proliferujących (Ki67+) i nieproliferujących (Ki67-) na podstawie ekspresji białka Ki67. Narządy przygotowano bez utrwalania zgodnie z protokołem producenta (<https://www.luminexcorp.com/muse-ki67-proliferation-kit/#overview>). Materiał analizowano za pomocą cytometru MUSE.

3.3.3.3 Zestaw Muse Oxidative Stress Kit (Merck Millipore, nr MCH100111)

Zestaw odczynników dedykowany jest analizie ilościowej populacji komórek ROS+ i ROS-. Materiał przygotowano zgodnie z protokołem producenta (chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclcfndmkaj/<https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-Oxidative-Stress-Kit-RSP.pdf>). Materiał analizowano za pomocą analizatora komórek MUSE (Ostróžka i in. 2024).

3.3.3.4 Zestaw Muse Annexin V & Cell Death Kit (Cytek, SKU MCH100105)

Zestaw odczynników umożliwia ilościową analizę komórek żywych, będących na wczesnym etapie apoptozy, późnym etapie apoptozy i nekrotycznych. Zawiesinę komórek barwiono i przygotowano do analizy zgodnie z protokołem producenta (chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclcfndmkaj/<https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-Annexin-V-&-Dead-Cell-Kit-RSP.pdf>). Materiał analizowano za pomocą analizatora komórek MUSE.

3.3.3.5 Zestaw Muse MultiCaspase Kit (Cytek, MCH100109)

Zestaw odczynników różnicuje komórki żywe/kaspaza(-), żywe/kaspaza(+), martwe/kaspaza(+) i martwe/kaspaza(-). Analizę przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w protokole producenta (<https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-MultiCaspase-Kit-RSP.pdf>). Materiał analizowano za pomocą analizatora komórek Muse Cell Analyzer (Ostróżka i in. 2024).

3.3.3.6 Zestaw Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit (Cytek, SKU MCH200105)

Zestaw Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit umożliwia pomiar całkowitego i fosforylowanego białka Bcl-2 za pomocą fosfospecyficznego przeciwciała anty-fosfo-Bcl-2 (Ser70)-Alexa Fluor 555 oraz sprzężonego przeciwciała anty-Bcl-2-PECy5. Przygotowanie materiału przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta (<https://cytekbio.com/products/muse-bcl-2-activation-dual-detection-kit?variant=40651391008804>). Materiał analizowano za pomocą analizatora komórek MUSE.

3.3.3.7 Zestaw Muse Multi-Color DNA Damage Kit (Cytek, MCH200107)

Zestaw Muse Multi-Color DNA Damage Kit (Cytek, MCH200107) umożliwia pomiar odsetka komórek nie posiadających uszkodzeń w DNA i komórek z DNA uszkodzonym (poprzez aktywację białka ATM, aktywację X2A.X). Materiał przygotowano zgodnie z protokołem producenta (<https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/muse-multi-color-dna-damage-kit-rsp.pdf>). Pomiary przeprowadzono za pomocą analizatora komórek Muse.

3.3.4 Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano pakiet programu STATISTICA 13.1. Za pomocą testu Shapiro-Wilka oceniano normalność rozkładu, z kolei za pomocą testu Levene'a zbadano dane pod kątem jednorodności wariancji dla równowagi wariancji błędów. Zastosowano metodę jednokierunkowej i dwukierunkowej/wielokierunkowej analizy wariancji (ANOVA/MANOVA), aby ocenić istotność różnic w poziomach analizowanych parametrów pomiędzy grupami eksperymentalnymi (rodzaj narządu/ stężenie BPA/ okres ekspozycji na BPA). Test Tukey'a ($p < 0,05$) zastosowano do oceny istotności różnic w poziomach analizowanych parametrów ilościowych pomiędzy grupami eksperymentalnymi w obrębie badanych narządów oraz okresów ekspozycji na BPA (Ostróżka i in. 2024).

4. Wyniki i dyskusja

H. Gorol, A. Ostróżka, G. Wilczek, Ł. Chajec, S. Student, A. Aleksa & M. Rost-Roszkowska. 2025. How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. The European Zoological Journal, 390–409. Vol. 92, No. 1, <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2463421>

Wpływ bisfenolu A na strukturę, ultrastrukturę oraz wybrane parametry cytotoksyczności został badany i opisany u *N. davidi* w nabłonku jelita środkowego. Jelito to utworzone jest przez dwa narządy: jelito oraz wątrobotrzustkę. Jelito jest prostym narządem rurowym nieposiadającym żadnych uchyłków. Natomiast wątrobotrzustka jest utworzona przez liczne uchyłki ślepo zakończone, a w każdym z nich można wyróżnić wyraźne regiony (strefy): dystalny, pośredni i proksymalny. Oba narządy są wyścielone nabłonkiem spoczywającym na bezkomórkowej błonie podstawnej. W jelicie nabłonek ten jest tworzony przez komórki trawienne (D) oraz regeneracyjne/embrionalne (E). W cewkach wątrobotrzustki wyróżnić można komórki embrionalne (E) w strefie dystalnej, komórki różnicujące się w strefie pośredniej oraz komórki magazynujące (B), resorpcyjne (R) i fibryllarne (F) (Sonakowska i in. 2015). Tak więc badania dotyczące wpływu bisfenolu A dotyczyły zmian w wymienionych komórkach obu narządów tworzących jelito środkowe badanego gatunku.

W przypadku zmian ultrastrukturalnych wywołanych obecnością bisfenolu A w wodzie, w nabłonku jelita w grupach 1In24 i 1In48 uwidoczniono wakuole o wnętrzu jasnym elektronowo, dodatkowo w grupie 1In48 w komórkach występowało wiele rozdętych cystern RER oraz pojedyncze, zdegenerowane mitochondria. W grupie 1In72h zaobserwowano większą liczbę zdegenerowanych mitochondriów oraz wakuoli o wnętrzu jasnym elektronowo, ale nie zaobserwowano zmian w budowie cystern RER, SER i aparatu Golgiego w porównaniu z grupą kontrolną. Budowa komórek w grupach 5In25 i 5In48 była bardzo podobna. W obu grupach w cytoplazmie okołojądrowej i podstawnej zaobserwowano liczne struktury elektronowo-gęste. W obu grupach w całej cytoplazmie uwidoczniono dużą liczbę zdegenerowanych mitochondriów oraz pojedyncze rozdęte cysterny RER, SER i kompleksy aparatu Golgiego. Liczne zmiany degeneracyjne zaobserwowano w grupach: 10In24, 10In48, 10In72. Wszystkie trzy grupy charakteryzowały się występowaniem rozdętych cystern RER, SER i aparatu Golgiego, mitochondriów, a także licznych wakuol o elektronowo-jasnym wnętrzu w cytoplazmie apikalnej i okołojądrowej. Dodatkowo w grupie 10In72 zaobserwowano rozległe zmiany nekrotyczne.

W nabłonku wątrobotrzustki osobników z grup 1H24, 1H48, 1H72 zaobserwowano zdegenerowane mitochondria w komórkach R i F, a w komórkach B zmniejszenie liczby kul z materiałem zapasowym. W grupach 5H24 i 5H48 zauważono w komórkach B, że cytoplazma staje się elektronowo jasna. W grupie 5H72 jasna elektronowo cytoplazma komórek R i B wykazywała także obecność licznych zdegenerowanych mitochondriów. Liczne zmiany zaobserwowano w grupie 10H24: w komórkach R znajdowały się liczne, zdegenerowane mitochondria, rozdęte cysterny RER i aparaty Golgiego, a także liczne, duże wakuole o elektronowo jasnym wnętrzu, z kolei w komórkach B zaobserwowano zdegenerowane mitochondria i bardzo często strawiony materiał zapasowy. Ponadto elektronowo jasna cytoplazma wielu komórek była uboga w organelle, wykazując zmiany nekrotyczne. We wszystkich typach komórek w grupie 10H48 zaobserwowano liczne wakuole, zdegenerowane mitochondria oraz intensywną autofagię, a w komórkach B dodatkowo materiał zapasowy był strawiony. Podobne zmiany wykazywały komórki nabłonka wątrobotrzustki osobników grupy 10H72.

Należy nadmienić, że nie zaobserwowano żadnych zmian w cytoplazmie komórek E oraz różnicujących się wątrobotrzustki, zmiany zaobserwowano jedynie w grupach 10In48 oraz 10In72. W tych przypadkach pojawiły się wyraźne zmiany nekrotyczne. W przypadku eksperymentów związanych z ekspozycją osobników *N. davidi* na inne stresory (np. głodzenie, pestycydy, nikiel) również nie zaobserwowano żadnych zmian na terenie komórek E jelita i wątrobotrzustki (Włodarczyk i in. 2017, 2019a, 2019b, Ostróżka i in. 2022, 2024, 2025). Prawdopodobnie związane jest to z faktem, że komórki te nie mają bezpośredniego kontaktu ze światłem jelita, a więc i ze spożywanym pokarmem (Sonakowska i in. 2015), a substancje toksyczne znajdujące się w pokarmie czy wodzie nie oddziałują bezpośrednio na te komórki. Ponieważ zmiany degeneracyjne nie były obserwowane w komórkach E wątrobotrzustki, można przypuszczać, że nie mając bezpośredniego kontaktu z pokarmem, nie będą narażone na działanie BPA. Tymczasem komórki jelita mogą mieć bezpośredni kontakt z masami pokarmowymi (pokarm i woda dostają się w pierwszej kolejności do jelita).

Zatem podsumowując badania wykorzystujące TEM, można stwierdzić, że ekspozycja organizmu na działanie BPA wywołuje zmiany w strukturze organelli w komórkach nabłonka jelita środkowego, co potwierdza hipotezę **H1**. Zmiany te można było zaobserwować zarówno w jelicie, jak i w wątrobotrzustce, a nasilenie zmian było tym większe, im dłużej zwierzę miało kontakt z toksycznym bisfenolem A oraz im wyższe stężenie bisfenolu A zastosowano. Za pośrednictwem transmisyjnej mikroskopii elektronowej udało się także potwierdzić hipotezę

H2, ponieważ ekspozycja organizmu na BPA wywołuje degenerację komórek i tkanek. Trzeba jednak nadmienić, że nie we wszystkich grupach badawczych zaobserwowano zmiany degeneracyjne. Narządy różnie reagowały na różne czasy ekspozycji na BPA oraz na różne stężenia BPA. Zmiany degeneracyjne obserwowane w komórkach D jelita były stopniowe i nasilały się wraz z rosnącym stężeniem BPA i czasem ekspozycji, podczas gdy wyraźnie widoczne zmiany degeneracyjne w komórkach wątrobotrzustki były obserwowane dopiero przy stężeniu 10mg/l. Ta obserwacja potwierdza, że wątrobotrzustka jest narządem mniej wrażliwym na toksyczne działanie BPA niż jelito (Włodarczyk i in. 2017, 2019a, 2019b, Ostróżka i in. 2022, 2024, 2025). Wykazano, że toksyczne działanie BPA prowadzi do wakuolizacji cytoplazmy, uszkodzenia jądra komórkowego oraz rozdęcia cystern RER i mitochondriów (Hasanluyi i in. 2016, Vijaykumar i in. 2017). Podobne zmiany degeneracyjne na poziomie ultrastrukturalnym wywołane obecnością bisfenolu A w środowisku obserwowano także u innych organizmów, w tym u *Drosophila melanogaster* (Yu i in. 2007, Li i in. 2009, Chen i in. 2022, Fabrello i in. 2024). Analiza TEM potwierdziła również, że ekspozycja na działanie BPA aktywuje autofagię w komórkach jelita jako mechanizm ochrony tkanek, ponieważ zbyt duża liczba organelli ulega uszkodzeniu pod jego wpływem (hipoteza **H3**), natomiast nie we wszystkich rodzajach komórek ani w każdej grupie badawczej zmiany te nie obserwowano. Badania ultrastrukturalne należało więc potwierdzić analizą jakościową i ilościową wykorzystującą mikroskopię konfokalną oraz cytometrię przepływową.

Do oceny autofagicznych, silnie kwaśnych struktur wykorzystano metodę LysoTracker Red w celu weryfikacji hipotezy **H3**. W przypadku jelita zaobserwowano, że intensywność sygnałów pochodzących z silnie kwaśnych organelli po ekspozycji na BPA wzrasta wraz z czasem ekspozycji w przypadku stężenia 5mg/l oraz 10mg/l, a w przypadku stężenia 1mg/l intensywność sygnałów wzrastała, jednak zaczynała maleć po 72 godzinach. Intensywność sygnałów pochodzących od silnie kwaśnych struktur (w tym autolizosomów i lizosomów) w przypadku wątrobotrzustki wzrastała wraz ze wzrostem stężenia i czasu ekspozycji na BPA we wszystkich grupach badawczych. W trakcie autofagii dochodzi do zamykania uszkodzonych organelli lub struktur komórkowych w obłonionych autofagosomach. Te, po fuzji z lizosomami tworzą autolizosomy, w których dzięki enzymom lizosomalnym zachodzą procesy trawienia, a więc uszkodzone struktury komórkowe ulegają neutralizacji. Nie dochodzi więc do aktywacji apoptozy ani do powstania stanu zapalnego, który następnie mógłby aktywować nekrozę. W ten sposób autofagia jest procesem umożliwiającym komórkom przetrwanie (Klionsky 2016, 2021). W jelicie *N. davidi* autofagia jest procesem ochronnym, który neutralizuje uszkodzone

przez różne stresory organelle komórkowe, tak więc pełni funkcję ochronną (Ostróżka i in. 2022, 2024). Analiza jelita środkowego *N. davidi* pod wpływem BPA z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej potwierdziła obserwacje ultrastrukturalne, jednocześnie potwierdzając wcześniejsze badania oraz hipotezę **H3**. Badania te jednocześnie częściowo potwierdziły ostatnią z hipotez, a więc **H8**, jednak aby ostatecznie ją potwierdzić, konieczne było przeprowadzenie dalszych badań. Autofagia jest także procesem, dzięki któremu dochodzi do trawienia materiału zapasowego, zwłaszcza lipidów, które są ważnym źródłem energii, szczególnie w procesach wymagających dużego nakładu ATP, oraz ważnym substratem w procesie lipofagii i lipolizy (Jaishy i Abel 2016, Zechner i in. 2017, Elander i in. 2018, Xie i in. 2020, Rost-Roszkowska i in. 2022). Proces ten jest autofagią selektywną i nazywany jest lipofagią (Lee i in 2021, Park i in. 2023). Zatem ważnym było również wykorzystanie odpowiednich barwień histochemicznych, dzięki którym można było stwierdzić, jakim zmianom podlegają nagromadzone w komórkach wątrobotrzustki struktury materiałów zapasowych. Obserwacje z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (barwienie BODIPY) oraz klasycznych metod histochemicznych (BPB, PAS) wykazały, że wraz z wydłużającym się czasem ekspozycji zwierząt na BPA dochodziło do zmniejszania ilości materiału zapasowego w komórkach B. W ten sposób zweryfikowano hipotezę **H4**. Korelowało to z intensywnie zachodzącą autofagią, dzięki której lipidy ulegały trawieniu. Na uwagę zasługuje jednak fakt pojawienia się lipidów w komórkach D jelita (hipoteza **H4**). Wykazano, że materiały zapasowe nie gromadzą się w cytoplazmie tych komórek u osobników kontrolnych (Sonakowska i in. 2015, Sonakowska-Czajka i in. 2021), jednakże inne badania sugerują, że materiały zapasowe mogą być obserwowane w cytoplazmie komórek D w przypadku osobników *N. davidi* traktowanych pestycydem (Ostróżka i in. 2022). Mikroskopia konfokalna wykazała, że w wątrobotrzustce ilość lipidów w proksymalnych częściach cewek, gdzie obecne są komórki B, zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia ksenobiotyku oraz wydłużaniem się czasu ekspozycji. Sugeruje to, że pod wpływem autofagii dochodzi do trawienia materiałów zapasowych w tym narządzie, a trawienie lipidów skorelowane z intensywną autofagią opisane było w komórkach B wątrobotrzustki osobników *N. davidi* eksponowanych na działanie dimetoatu i niklu (Ostróżka i in. 2022, 2024). Dzięki tym badaniom potwierdziliśmy hipotezy **H3** oraz **H4**.

W celu weryfikacji hipotezy **H5** wykorzystano transmisyjną mikroskopię elektronową, zestaw MUSE Ki67 Proliferation Kit oraz zestaw MUSE Cell Cycle. W każdej z grup kontrolnych i eksperymentalnych w TEM zaobserwowano podziały komórek E, jednak zmiany degeneracyjne (zdegenerowane mitochondria, rozdęte aparaty Golgiego, wakuole z wnętrzem

przepuszczającym elektrony) wykryto w cytoplazmie tych komórek u osobników w grupach 10In48 oraz 10In72. W stężeniach BPA niższych niż 10mg/l nie obserwowano zmian degeneracyjnych w komórkach.

Zestaw MUSE Ki67 pozwala na ilościową analizę komórek proliferujących (Ki67+) i nieproliferujących (Ki67-) na podstawie ekspresji białka Ki67. Białko to jest uważane za dobry wskaźnik proliferacji komórek, ponieważ jest aktywowane tylko podczas aktywnych faz cyklu komórkowego (Bullwinkel i in. 2006). Wykryto, że odsetek komórek Ki67+ był wyższy w jelicie niż w wątrobotrzustce, niezależnie od stężenia BPA i czasu ekspozycji. Odsetek komórek Ki67+ był wyższy w grupie kontrolnej niż w grupach 1In24 i 1In48 oraz 5In24 i 5In48. Z kolei w grupach 10In24, 10In48 oraz 10In72 odsetek komórek Ki67+ był prawie dwukrotnie niższy niż w grupie kontrolnej CIn. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupą kontrolną CIn, a grupami, w których jelito było narażone na BPA przez 72h. W przypadku wątrobotrzustki tylko w grupie 1H24 zaobserwowano prawie dwukrotnie wyższy odsetek komórek Ki67+ w porównaniu do pozostałych grup, a z kolei pomiędzy grupami 1H24 i 1H48 zaobserwowano istotne statystycznie różnice. Badania za pomocą zestawu MUSE Ki67 wskazują, że w obu narządach liczba komórek Ki67+ maleje wraz ze wzrostem stężenia i czasu ekspozycji na BPA, chociaż w wątrobotrzustce spadek ten nie jest istotny statystycznie. Powyższe obserwacje mogą sugerować zahamowanie proliferacji komórek E pod wpływem BPA, jednakże w komórkach E wątrobotrzustki zmiany ultrastrukturalne nie były widoczne.

Cykl komórkowy badano ilościowo za pomocą zestawu MUSE Cell Cycle. W grupach 10In24, 10In48 oraz 10In72 obserwowano zmniejszenie liczby komórek w fazie G0/G1 w porównaniu z grupą kontrolną CIn. Istotne zmniejszenie odsetka komórek w fazie G0/G1 zaobserwowano także w grupach 1In72, 5In24 oraz 5In72. W przypadku wątrobotrzustki wykazano istotny statystycznie spadek liczby komórek w fazie G0/G1 w grupach 5H48 oraz 10H48. W przypadku liczby komórek będących w fazie S cyklu komórkowego, jedyne istotne statystycznie różnice zaobserwowano w grupie 5H48, w porównaniu z grupą kontrolną zmniejszył się odsetek komórek w fazie S. W przypadku fazy G2/M, zarówno w jelicie, jak i wątrobotrzustce zaobserwowano istotne statystycznie różnice we wzroście liczby komórek w tej fazie, we wszystkich grupach traktowanych bisfenolem A w stężeniach 5 i 10mg/l po 24, 48 oraz 72 godzinach ekspozycji. Zaobserwowano również istotny statystycznie wzrost odsetka komórek w fazie G2/M w grupie 1In72 w porównaniu z grupą kontrolną. Uszkodzenie DNA prowadzi do zatrzymania komórki w fazie G1, przez co nie wchodzi ona w fazę S i (Trzcińska 2003). W przypadku uszkodzeń tkanek i narządów lub aktywacji śmierci komórkowej, może

dojść do zwiększenia liczby podziałów komórkowych, w celu utrzymania homeostazy (Amcheslavsky i in. 2009, Istifli i in. 2019, Lee i in. 2021). Zaobserwowano również, że wakuolizacja komórek E jelita była skorelowana ze spadkiem liczby komórek Ki67+ oraz komórek w fazach S i G2/M, czego powodem może być wyższa wrażliwość komórek jelita na działanie ksenobiotyków w porównaniu do komórek wątrobotrzustki u skorupiaków (Ostróżka i in. 2022, 2024). Wyniki wskazują, że BPA może powodować zwiększenie lub zmniejszenie proliferacji, w zależności od stężenia i czasu ekspozycji zwierząt na ten ksenobiotyk, co potwierdza hipotezę **H5**.

W przypadku zmian ilościowych, stężenie BPA było zmienną, która miała największy wpływ na różnice między grupami badawczymi, w porównaniu do reszty zmiennych (rodzaj narządu, czas ekspozycji na BPA). Wykazano łączny wpływ wszystkich zmiennych w przypadku zmian parametrów cyklu komórkowego i liczby komórek Ki67+. Zmienna dotycząca rodzaju narządu miała istotne znaczenie w przypadku ilościowych zmian w komórkach Ki67+ i komórkach w fazie S, a z kolei czas ekspozycji na BPA był zmienną istotną w odniesieniu do ilościowych zmian w komórkach w fazach G0/G1 i G2/M oraz Ki67+.

H. Gorol, Ł. Chajec, G. Wilczek, S. Student, A. Ostróżka & M. Rost-Roszkowska. 2026. Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. The European Zoological Journal VOL. 93, NO. 1, 563–582 <https://doi.org/10.1080/24750263.2026.2652113>.

W celu dodatkowego zweryfikowania hipotezy **H2** (Gorol i in. 2025 przedstawiają wyniki uzyskane jedynie na podstawie analizy TEM), a także ustalenia, które procesy śmierci komórkowej są aktywowane, przeprowadzono badania wykorzystujące cytometrię przepływową oraz zestawy: Muse Annexin V & Cell Death Kit, Muse MultiCaspase Kit oraz Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit. Wszelkie stresory mogą aktywować w komórkach liczne procesy cytotoksyczne, które będą miały na celu utrzymanie homeostazy komórek lub tkanek. Takim procesem jest między innymi apoptoza, dzięki której obumierają pojedyncze komórki lub grupy komórek, nie dopuszczając ostatecznie do powstania stanu zapalnego prowadzącego do nekrozy (Chen i in. 2022, Vogler i in. 2025). U *N. davidi* BPA indukuje śmierć komórek poprzez nekrozę i apoptozę. Istotnie statystycznie różnice zaobserwowano w grupie 10In72 (aż czterokrotny wzrost odsetka wczesnych zmian apoptotycznych względem grupy kontrolnej), z kolei w grupach 1In24, 1In48 i 1In72 zaobserwowano dwukrotny wzrost odsetka wczesnej apoptozy. Czterokrotny wzrost liczby komórek późnej apoptozy w porównaniu do grupy kontrolnej zaobserwowano w wątrobotrzustce we wszystkich grupach, zarówno przy stężeniach 1, 5, 10 mg/l, jak i czasach ekspozycji 24, 48, 72 godziny. Najwyższy odsetek komórek nekrotycznych zaobserwowano w grupie 5In24 (poziom pięciokrotnie wyższy niż w grupie kontrolnej). W przypadku wątrobotrzustki wzrost liczby komórek nekrotycznych zaobserwowano w grupach 5H24, 5H48, 5H72. Tak więc wzrost intensywności apoptozy jest szczególnie zauważalny w wątrobotrzustce, natomiast w jelicie zmiany są najbardziej widoczne przy najwyższym stężeniu BPA w wodzie. Jednakże można stwierdzić, że nekroza jest procesem dominującym w obu analizowanych narządach. Nekroza w jelicie i wątrobotrzustce dorosłych osobników oraz larw *N. davidi* w stanie fizjologicznym została dokładnie opisana przez Sonakowską i in. (2016) oraz Sonakowska-Czajka i in (2021). Mniejszy udział apoptozy niż nekrozy w procesach degeneracji nabłonka jelita środkowego pod wpływem BPA potwierdzają badania dotyczące liczby komórek, w których nastąpiła aktywacja kaspazy – zmiany te nie są statystycznie istotne (wykorzystanie zestawu Muse MultiCaspase Kit). Jak wiadomo, kaspazy są białkami enzymatycznymi uczestniczącymi we wszystkich szlakach apoptotycznych (Mustafa i in. 2024, Vogler i in. 2025). Apoptoza jest również regulowana przez rodzinę białek Bcl-2, w obrębie których występują białka pro- i antyapoptotyczne. Aktywacja

antyapoptotycznego białka Bcl-2 ma na celu zablokowanie apoptozy w komórkach (Warren i in. 2019, Nguyen i in. 2024, Vogler i in. 2025). W grupie 1In48 zaobserwowano najwyższy odsetek komórek Bcl-2-pozytywnych, a w grupie 10In72 - również istotny wzrost liczby tych komórek (zmiany czterokrotnie wyższe niż w grupie kontrolnej CIn). Nie było istotnych statystycznie różnic w liczbie komórek Bcl-2-negatywnych w żadnej z grup względem grup kontrolnych zarówno w jelicie, jak i w wątrobotrzustce. Dwukrotny wzrost liczby komórek z brakiem ekspresji białka Bcl-2 zaobserwowano w grupach 1In24, 1In48 oraz 1H24 i 1H48, z kolei w grupie 1H72 liczba tych komórek istotnie spadła względem grupy kontrolnej. Zarówno w jelicie, jak i w wątrobotrzustce osobników *N. davidi* traktowanych BPA, dominującym rodzajem śmierci komórkowej jest więc nekroza, jednakże apoptoza również została zidentyfikowana, a wzrost jej intensywności był wyraźny w wątrobotrzustce, podczas gdy zmiany w jelicie były najbardziej widoczne w stężeniu 10mg/l BPA. Powyższe badania potwierdziły, że ekspozycja organizmu na działanie BPA wywołuje degenerację (apoptozę/nekrozę) komórek i tkanek (potwierdzenie hipotezy **H2**).

W celu weryfikacji hipotez **H6** i **H7** wykorzystano zestaw Muse Oxidative Stress Kit i Muse Multi-Color DNA Damage Kit oraz barwienia odczynnikami JC-1 i ThiolTracker, a także transmisyjną mikroskopię elektronową. Zaobserwowano najwyższy i jedyny istotny statystycznie odsetek komórek ROS⁺ (średnio dwukrotnie wyższy w porównaniu do grup kontrolnych) po 24 godzinach ekspozycji na BPA zarówno w przypadku jelita, jak i wątrobotrzustki, niezależnie od stężenia BPA. Jednakże po 48 i 72 godzinach eksperymentu obserwowano spadek poziomu ROS. Jak wiadomo, niski poziom ROS reguluje liczne procesy metaboliczne, działając jako mediatorzy i regulatory różnych procesów fizjologicznych oraz uczestnicząc w przekazywaniu sygnałów między komórkami (Dröge 2002). ROS uczestniczą również w procesach odpornościowych i starzeniu komórek, a ich poziom będzie decydował o tym, czy komórki wejdą na ścieżkę śmierci, czy przetrwania (An i in. 2024). Podwyższony poziom ROS prowadzi do toksycznego uszkodzenia organelli komórkowych, białek komórkowych, DNA lub całych komórek, a w konsekwencji do uruchomienia procesów śmierci komórkowej. Występuje wówczas stres oksydacyjny (Schieber i Chandel 2014, Akhtar i in. 2017). Działanie BPA prowadzi również do uszkodzenia DNA (Susiarjo i in. 2013, Di Pietro i in. 2020, Perin i in., 2022). Zarówno w jelicie, jak i w wątrobotrzustce *N. davidi* w komórkach zaobserwowano rozdętą otoczkę jądrową i gęste elektronowo skupiska chromatyny w jądrze komórkowym przy 48- i 72-godzinnej ekspozycji na BPA. W niektórych jądrach komórkowych komórek D zaobserwowano struktury blaszkowe. Test Total DNA damage

wykazał, zarówno w jelicie, jak i w wątrobotrzustce, we wszystkich grupach traktowanych BPA przez 48 godzin, wzrost liczby komórek z uszkodzonym DNA. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA dochodzi do aktywacji jego procesów naprawczych (Srinivas i in. 2019). Jak opisano w publikacji Gorol i in. (2025) po 48 h eksperymentu odnotowano wzrost liczby komórek, w których intensyfikacji ulega synteza DNA, a w jelicie dodatkowo zwiększa się liczba komórek proliferujących. Tak więc stopniowy spadek zarówno poziomu ROS, jak też uszkodzeń DNA po ekspozycji zwierząt na BPA wyraźnie aktywuje mechanizmy obronne w nabłonkach obu narządów, co wykazane zostało w niniejszej publikacji.

Mitochondria są organellami, które, poza udziałem w procesach energetycznych komórki, odgrywają także między innymi ważną rolę w aktywacji śmierci komórkowej wywołanej stresem oksydacyjnym (Kamogashira i in. 2015). U *N. davidi* hodowanej w wodzie zawierającej BPA, aktywność mitochondriów badano za pomocą odczynnika JC1 i mikroskopii konfokalnej. Zarówno w jelicie, jak i wątrobotrzustce wraz ze wzrostem stężenia BPA oraz czasu ekspozycji wzrasta liczba zielonych sygnałów, które są emitowane przez nieaktywne mitochondria. Wzrost sygnałów czerwonych/pomarańczowych, emitowanych przez mitochondria aktywne, zaobserwowano jedynie w grupie 5In48. Za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazano wiele zmian w strukturze mitochondriów (uszkodzone błony, rozdęte mitochondria, macierz jasna elektronowo, skrócenie grzebieni mitochondrialnych) we wszystkich grupach eksperymentalnych. Zdegenerowane mitochondria podczas badań nad wpływem czynników stresowych na *N. davidi* zaobserwowano już wcześniej (Włodarczyk i in. 2019a, 2019b, Ostróżka i in. 2022, Ostróżka i in. 2025). Mitochondria to jedne z organelli, które odpowiadają za syntezę ROS i mają wpływ na aktywację śmierci komórkowej (Martin 2010, Kamogashira i in. 2015, Włodarczyk i in. 2019b, Ostróżka i in. 2025), jednak akumulacja ROS może prowadzić do zmian potencjału błony mitochondrialnej poprzez uszkodzenia układu enzymatycznego mitochondrium (Koizumi i in. 1994, Cannino i in. 2009, Rost-Roszkowska i in. 2021a). Ważną rolę w ochronie tych organelli, a także DNA, odgrywają liczne substancje antyoksydacyjne modulujące stężenie ROS (Chelikani i in. 2004, Johnson i Giulivi 2005, Lubberda 2005, Combelles i in. 2009). Do takich przeciwutleniaczy redukujących stres oksydacyjny należy między innymi GSH (zredukowany glutation) (Kvedariene i in. 2025), jednak utrzymywanie GSH na wysokim poziomie w warunkach braku stresu oksydacyjnego może prowadzić do uszkodzeń (Fernández-Checa i in. 2005). W warunkach stresu oksydacyjnego GSH oddając elektron ROS, takim jak rodnik hydroksylowy, czy nadtlenki, będzie ulegał utlenieniu tworząc utlenioną formę glutationu

(GSSG) (Forman i in. 2009). Poziom komórkowy GSH u osobników *N. davidi* poddanych ekspozycji na BPA badano za pomocą odczynnika ThiolTracker Violet i mikroskopii konfokalnej. W badaniach, zarówno w jelicie, jak i w wątrobotrzustce, poziom GSH wzrósł po 24 i 48 godzinach ekspozycji na BPA (wyjątek stanowi grupa 5In48). W grupach traktowanych BPA przez 72 godziny, zwłaszcza w wątrobotrzustce, zaobserwowano, że liczba sygnałów emitowanych przez GSH spadła. Wyniki te wskazują na udział GSH w procesach obniżenia poziomu stresu oksydacyjnego u badanego gatunku, jednak konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań związanych z tym zagadnieniem, a więc na przykład analiza wybranych enzymów antyoksydacyjnych jak katalaza, peroksydaza, czy dysmutaza ponadtlenkowa. Podsumowując, na podstawie wyżej opisanych badań udało się potwierdzić hipotezy **H6 i H7**, a więc można stwierdzić, że BPA w środowisku wywołuje zmiany w potencjale błonowym mitochondriów, w syntezie ROS oraz w aktywności GSH.

Porównując wszystkie uzyskane dane, w przypadku weryfikacji hipotezy **H8** można stwierdzić, że czas ekspozycji był zmienną, która miała największy wpływ na zmiany wszystkich mierzonych parametrów, w porównaniu do innych parametrów, takich jak stężenie BPA oraz rodzaj narządu. Zaobserwowano istotne statystycznie interakcje między czasem trwania ekspozycji a typem narządu, a także między stężeniem BPA a typem narządu w przypadku metod z wykorzystaniem odczynników Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit i Muse Milticaspase Kit. Podczas badania z wykorzystaniem tej ostatniej metody, zaobserwowano łączny wpływ wszystkich trzech czynników. Istotny wpływ na zmienność parametrów miał typ narządu i czas ekspozycji w przypadku analizy zmian apoptotycznych i nekrotycznych, poziomu ROS i uszkodzeń DNA, a statystycznie istotny wpływ na wszystkich czynników (łączny efekt i interakcje dwukierunkowe) wykazano jedynie w trakcie badania odsetka komórek z uszkodzeniem DNA.

5. Wnioski

1. Zgodnie z hipotezą **H1** wykazano, że ekspozycja na działanie BPA wywołuje zmiany w strukturze organelli w komórkach nabłonka jelita środkowego, zarówno w jelicie, jak i w wątrobotrzustce. Należy wysnuć wniosek, że zmiany nasilają się wraz ze wzrostem stężenia BPA oraz czasem ekspozycji na jego szkodliwe działanie.
2. Potwierdzono hipotezę **H2**, zgodnie z którą ekspozycja organizmu na działanie BPA wywołuje degenerację (apoptozę/nekrozę) komórek i tkanek. Należy jednak nadmienić, że nie wszystkie narządy i tkanki reagują tak samo na BPA, ponadto występowanie zmian degeneracyjnych było zależne od stężenia substancji toksycznej oraz czasu ekspozycji. Na podstawie wyników można potwierdzić, że wątrobotrzustka jest narządem mniej wrażliwym na działanie BPA niż jelito. Dodatkowo wykazano, że nekroza jest dominującym rodzajem śmierci komórkowej w przypadku krewetki *N. davidi* traktowanej BPA.
3. Ekspozycja na działanie szkodliwego BPA aktywuje autofagię w komórkach jelita jako mechanizmu ochrony tkanek, ponieważ zbyt duża liczba organelli ulega uszkodzeniu pod wpływem jego działania, co jest potwierdzeniem hipotezy **H3**. Należy jednak zaznaczyć, że nie obserwowano aktywacji autofagii w każdym rodzaju komórek i w każdej grupie badawczej, co może świadczyć o różnym wpływie BPA na komórki jelita środkowego w zależności od rodzaju narządu, stężenia i czasu ekspozycji na ksenobiotyk. Ponadto wykazano, że oprócz autofagii, w ochronie komórek przed toksycznym działaniem BPA bierze udział trawienie lipidów jako mechanizm związany ze zwiększonym zapotrzebowaniem komórki na energię (potwierdzenie hipotezy **H4**).
4. Wyniki wskazują, że BPA w środowisku wpływa na zmiany cyklu komórkowego oraz proliferację komórek jelita środkowego, co potwierdza hipotezę **H5**. Badania wskazują, że wrażliwość jelita na działanie BPA prawdopodobnie jest wyższa niż w przypadku wątrobotrzustki. Ponadto, BPA może powodować zwiększenie lub zmniejszenie proliferacji komórek macierzystych, w zależności od stężenia i czasu ekspozycji zwierząt na ten ksenobiotyk, więc może on mieć działanie anty- lub pro-proliferacyjne.
5. Potwierdzono również hipotezę **H6** i wykazano, że BPA w środowisku wywołuje zmiany w potencjale błonowym mitochondriów, w syntezie ROS oraz aktywności systemu antyoksydacyjnego, ponieważ BPA powoduje uszkodzenie mitochondriów.

6. Zauważono również, że istnieje wyraźna zależność pomiędzy zmianami pojawiającymi się na terenie komórek, organelli, stężeniem ROS i enzymów antyoksydacyjnych na skutek ekspozycji organizmu na działanie BPA, co potwierdziło hipotezę **H7**.
7. W obu narządach tworzących jelito środkowe, pod wpływem BPA w środowisku, aktywowane są takie same procesy cytotoksyczne, a ich intensywność zależy od czasu ekspozycji zwierząt oraz stężenia BPA.

Podsumowując, można stwierdzić, że BPA obecny w środowisku wodnym wyraźnie wpływa na aktywację procesów cytotoksycznych w badanym narządzie słodkowodnej krewetki, pomimo faktu, że w ramach niniejszych badań nie badano wszystkich parametrów cytotoksyczności, a jedynie wybrane. Tak więc z całą pewnością badania wymagają dalszych analiz, dla których niniejsze wyniki powinny stanowić podstawę.

6. Literatura

1. Aaser M. A., Mosleh M. A. 2024. Oxidative stress: an overview of past research and future insights, *All Life*, 17:1, 2316092, DOI: 10.1080/26895293.2024.2316092.
2. Akhtar M.J., Ahamed M., Alhadlaq H.A., Alshamsan A. 2017. Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: potential implications in ROS associated degenerative disorders. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861, 802–813. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.01.018.
3. Amcheslavsky A, Jiang J, Ip YT. 2009. Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* 4(1):49–61. DOI: 10.1016/j.stem.2008.10.016.
4. An X., Yu W., Liu J., Tang D., Yang L., Chen X. 2024. Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death Dis.* 15, 556. DOI:10.1038/s41419-024-06939-5.
5. Anger K. 2001. The biology of decapod crustacean vae. The Netherlands: AA Balkema Publishers.
6. Bednarska A.J., Świątek Z. 2016. Subcellular partitioning of cadmium and zinc in mealworm beetle (*Tenebrio molitor*) larvae exposed to metal-contaminated flour. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 133:82–89. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.06.033.
7. Björnsdotter M.K., de Boer J., Ballesteros-Gómez A. 2017. Bisphenol a and replacements in thermal paper: A review. *Chemosphere* 182:691–706. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.070.
8. Brigelius-Flohé R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 27(9–10):951–965. DOI: 10.1016/s0891-5849(99)00173-2.
9. Bullwinkel J., Baron-Lühr B., Lüdemann A., Wohlenberg C., Gerdes J., Scholzen T. 2006. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *Journal of Cellular Physiology* 206(3):624–635. DOI:10.1002/jcp.20494.
10. Candas D., Li J.J.. 2014. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid Redox Signal* 1 20(10):1599–1617. DOI: 10.1089/ars.2013.5305.
11. Canesi L., Fabbri E. 2015. Environmental effects of BPA: Focus on aquatic species. Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society 13(3):1559325815598304. DOI: 10.1177/1559325815598304.

12. Cannino G., Ferruggia E., Luparello C., Rinaldi A.M. 2009. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9(6):377–384. DOI: 10.1016/j.mito.2009.08.009.
13. Careghini A., Mastorgio A.F., Saponaro S., Sezenna E. 2015. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: A review. *Environmental Science and Pollution Research* 22(8):5711–5741. DOI: 10.1007/s11356-014-3974-5.
14. Castritsi-Catharios J., Syriou V., Miliou H., Zouganelis G.D. 2013. Toxicity effects of bisphenol a to the nauplii of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 19:38–45.
15. Çelik T.A. 2018. Introductory Chapter: Cytotoxicity. In *Cytotoxicity*. InTech. DOI: 10.5772/intechopen.77244.
16. Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61(2):192–208. DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5.
17. Chen Z., Wang F., Wen D., Mu R. 2022. Exposure to bisphenol a induced oxidative stress, cell death and impaired epithelial homeostasis in the adult *Drosophila melanogaster* midgut. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 248:114285. DOI:10.1016/j.ecoenv.2022.114285.
18. Coleman Ch.O. 1990. Anatomy of the alimentary canal of *Parandania boeckii* (Stebbing, 1888) (Crustacea, Amphipoda, Stegocephalidae) from the Antarctic Ocean. *J Nat Hist.*, 24: 1573-1585. DOI: 10.1080/00222939000770901.
19. Combelles C.M., Gupta S., Agarwal A. 2009. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reproductive Biomedicine Online* 18(6):864–880. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60038-7.
20. Corrales J., Kristofco L.A., Steele W.B., Yates B.S., Breed C., Williams E.S., Brooks B.W. 2015. Global assessment of bisphenol a in the environment: Review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. *Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society* 13(3):1559325815598308. DOI: 10.1177/1559325815598308.
21. Crain D.A., Eriksen M., Iguchi T., Jobling S., Laufer H., LeBlanc G.A., Guillette Jr. L.J. 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology* 24(2):225–239. DOI: 10.1016/j.reprotox.2007.05.008.
22. D’Arcy M. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International* ISSN 1065-6995. DOI: 10.1002/cbin.11137.

23. Dawood A.S., Abaas H.K. 2022. Histopathological study of the effect of glutathione in decreasing pathological changes induced by Estrogen in internal organs of albino mice. *Int. J. Health Sci.* 6, 1019–1034 (2022). DOI: 10.53730/ijhs.v6ns5.8805.
24. Di Pietro P., D’Auria R., Viggiano A., Ciaglia E., Meccariello R., Russo R.D., Puca A.A., Vecchione C., Nori S.L., Santoro A. 2020. Bisphenol a induces DNA damage in cells exerting immune surveillance functions at peripheral and central level. *Chemosphere* 254:126819. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126819.
25. Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.
26. Elander P.H., Minina E.A., Bozhkov P.V., Raines C. 2018. Autophagy in turnover of lipid stores: Trans-kingdom comparison. *Journal of Experimental Botany* 69(6):1301–1311. DOI: 10.1093/jxb/erx433.
27. Fabrello J., Guidorizzi S., Ciscato M., Battistuzzi M., Moschin E., Vecchia F.D., Moro I., Roverso M., Bogialli S., Matozzo V. 2024. Ultrastructural changes, pigment responses and bioac- cumulation in the microalga *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin exposed to BPA analogues. *Aquatic Toxicology* 272:106970. DOI: 10.1016/j.aquatox.2024.106970.
28. Fabrello J., Matozzo V. 2022. Bisphenol analogs in aquatic environments and their effects on marine species – a review. *Journal of Marine Science and Engineering* 10(9):1271. DOI: 10.3390/jmse10091271.
29. Fernández-Checa J.C., García-Ruiz C., Colell A., Morales A., Mari M., Miranda M., Ardite E. 2005. Oxidative stress: Role of mitochondria and protection by glutathione. *BioFactors* 25(1–4):1–13. DOI: 10.1002/biof.5520080102.
30. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 1–12. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
31. Franzetti E., Huang Z.J., Shi Y.X., Xie K., Deng X.J., Li J.P., Li Q., Yang W-Y, Zeng W-N, Casartelli M, Deng H-M, appellozza S, Grimaldi A, Xia Q, Tettamanti G, Cao Y, Feng Q. 2012. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis* 17(3):305–324. DOI: 10.1007/s10495-011-0675-0.
32. Gao Q., Jiang L., Sun Y., An X., Sun W., Tang S., Kang X., Zhao X., Li Z., Liu C., Ji H., Lian F. 2025. Oxidative stress: from molecular studies to clinical intervention strategies. *Front. Mol. Biosci.* 12:1638042. DOI: 10.3389/fmolb.2025.1638042.

33. Gerhardt A. 2019. Plastic additive bisphenol A: Toxicity in surface- and groundwater crustaceans. *Journal of Toxicology and Risk Assessment* 5(1):017. DOI: 10.23937/2572-4061.1510017.
34. Gonkowski S., Makowska K. 2022. Environmental pollution with bisphenol A and phthalates - a serious risk to human and animal health. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(21):13983. DOI: 10.3390/ijerph192113983.
35. González-Olalla J.M., Vila-Duplá M., Cabrerizo M.J., González-Egea I., Parra G., Medina-Sánchez J.M., Carrillo P. 2024. How does increasing temperature affect the toxicity of bisphenol a on *Cryptomonas ovata* and its consumer *Daphnia magna*? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 285:117090. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.117090.
36. Gross L. (2007) The Toxic Origins of Disease. *PLoS Biol* 5(7): e193. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050193.
37. Hasanluyi E.A., Khojasteh S.M.B., Nejhad D.M. 2016. Investigation of the effects of bisphenol a on the histology and ultrastructure of prostate and seminal vesicle glands in rats. *Thrita Journal of Neuron* 5(4):e38611. DOI: 10.5812/thrita.38611.
38. Herrera-Alvarez L., Fernandez I., Benito J., Pardos F. 2000. Ultrastructure of the midgut and hindgut of *Derocheilocaris remanei* (Crustacea, Mystacocarida). *J Morphol.* 244: 177–189. PMID: 10815001. DOI: 10.1002/(sici)1097-4687(200006)244:3<177::aid-jmor3>3.0.co;2-d.
39. Istifli E.S., Hüsunet M.T., İla H.B. 2019. Cell division, cytotoxicity, and the assays used in the detection of cytotoxicity. In: Istifli E, İla H, editors. *Cytotoxicity – definition, identification, and cytotoxic compounds*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.88368.
40. Jabłońska A., Mamos T., Gruszka P., Szlauer-Łukaszewska A., Grabowski M. 2018. First record and DNA barcodes of the aquarium shrimp, *Neocaridina davidi*, in Central Europe from thermally polluted River Oder canal, Poland. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 419(14):1–5. DOI: 10.1051/kmae/2018004.
41. Jaishy B., Abel E.D. 2016. Lipids, lysosomes, and autophagy. *Journal of Lipid Research* 57(9):1619–1635. DOI: 10.1194/jlr.R067520.
42. Johnson F., Giulivi C. 2005. Superoxide dismutases and their impact upon human health, *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 26, Issues 4–5, Pages 340-352, ISSN 0098-2997, DOI: 10.1016/j.mam.2005.07.006.
43. Jurek A., Leitner E. 2018. Analytical determination of bisphenol a (BPA) and bisphenol analogues in paper products by LC- MS/MS. *Food additives & contaminants. Part A:*

- Chemistry, analysis, control. Exposure and Risk Assessment 35 (11):2256–2269. DOI: 10.1080/19440049.2018.1524157.
44. Kamogashira T., Fujimoto C., Yamasoba T. 2015. Reactive oxygen species, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in hearing loss. BioMed Research International 2015:617207. DOI: 10.1155/2015/617207.
 45. Klionsky D. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy 12 (1):1–222. DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356.
 46. Klionsky D. 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) 1. Autophagy 17(1):1–382. DOI: 10.1080/15548627.2020.1797280.
 47. Koizumi T., Yokota T., Shirakura H., Tatsumoto H., Suzuki K.T. 1994. Potential mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: Inhibitory action of cadmium on mitochondrial respiratory activity. Toxicology 92(1–3):115–125. DOI: 10.1016/0300-483x(94)90171-6.
 48. Kvedariene V., Vaskovic M., Semyte J.B. 2025. Role of oxidative stress and antioxidants in the course of atopic dermatitis. International Journal of Molecular Sciences 26(9):4210. DOI: 10.3390/ijms26094210.
 49. Lee C-C, Jiang L.Y., Kuo YL, Chen C, Hsieh C, Hung C, Tien CJ. 2015. Characteristics of nonylphenol and bisphenol A accumulation by fish and implications for ecological and human Health. Science of the Total Environment 502:417–425. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.09.042.
 50. Lee J., Park H., Yoon J. 2003. Ozonation characteristics of bisphenol a in water. Environmental Technology 24(2):241–248. DOI: 10.1080/09593330309385555.
 51. Lee S.H., Goo T.W., Yun E.Y. 2021. *Allomyrina dichotoma* larval extract has protective effects against gut permeability of dextran sulfate sodium-fed *Drosophila* by E-cadherin and armadillo. Journal of Ethnopharmacology 279:113786. DOI:10.1016/j.jep.2021.113786.
 52. Li D., Chen H., Bi R., Xie H., Zhou Y., Luo Y., Xie L. 2018. Individual and binary mixture effects of bisphenol a and a lignin-derived bisphenol in *Daphnia magna* under chronic exposure. Chemosphere 191:779–786. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.022.
 53. Li H., Horke S., Forstermann U. 2013. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. Trends Pharmacol Sci. 34(6):313–9. DOI: 10.1016/j.tips.2013.03.007.

54. Li H., Zhang Z., Sun Y., Wang W., Xie J., Xie C., Hu Y., Gao Y., Xu X., Mai B. 2021. Tetrabromobisphenol a and hexabromocyclododecanes in sediments and biota from two typical mangrove wetlands of South China: Distribution, bioaccumulation and biomagnification. *Science of the Total Environment* 750:141695. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141695.
55. Li R., Chen G.Z., Tam N.F.Y., Luan T.G., Shin P.K., Cheung S.G., Liu Y. 2009. Toxicity of bisphenol a and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 72(2):321–328. DOI:10.1016/j.ecoenv.2008.05.012.
56. Liang J., Ch L., Dang Y., Feng X., Ji X., Liu X., Zhao X., Zhang Q., Ren Z., Wang Y., Li Y., Qu G., Liu R. 2024. Occurrence of bisphenol a analogues in the aquatic environment and their behaviors and toxicity effects in plants. *Environment International* 193:109105. DOI: 10.1016/j.envint.2024.109105.
57. Luberda Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology* 5(1):5–17.
58. Malagoli D., Abdalla F.C., Cao Y., Feng Q., Fujisaki K., Gregorc A., Matsuo T., Nezis I.P., Papassideri I.S., Sass M., Silva-Zacarin E.C., Tettamanti G., Umemiya-Shirafuji R. 2010. Autophagy and its physiological relevance in arthropods current knowledge and perspectives. *Autophagy* 6(5):575–588. DOI: 10.4161/auto.6.5.11962.
59. Marí M., de Gregorio E., de Dios C., Roca-Agujetas V., Cucarull B., Tutusaus A., Morales A., Colell A. 2020. Mitochondrial Glutathione: Recent Insights and Role in Disease. *Antioxidants*, 9(10), 909. DOI: 10.3390/antiox9100909.
60. Martin L.J. 2010. Mitochondrial and cell death mechanisms in neurodegenerative diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 3 (4):839–915. DOI: 10.3390/ph3040839.
61. Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M., Klionsky D.J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature* 451, 1069–1075. DOI: 10.1038/nature06639.
62. Muhamad M.S., Salim M.R., Lau W.J., Yusop Z. 2016. A review on bisphenol A occurrences, health effects and treatment process via membrane technology for drinking water. *Environmental Science and Pollution Research International*. Jun;23(12):11549-11567. DOI: 10.1007/s11356-016-6357-2.
63. Mustafa M., Ahmad R., Tantry I.Q., Ahmad W., Siddiqui S., Alam M., Abbas K., Moinuddin, Hassan M.I., Habib S., Islam S. 2024. Apoptosis: A comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. *Cells* 13(22):1838. DOI: 10.3390/cells13221838.

64. Napolitano G., Fasciolo G., Venditti P. 2021. Mitochondrial management of reactive oxygen species. *Antioxidants (Basel)* 10, 1824. DOI:10.3390/antiox10111824.
65. Neri I., Russo G., Grumetto L. 2024. Bisphenol a and its analogues: From their occurrence in foodstuffs marketed in Europe to improved monitoring strategies – a review of published literature from 2018 to 2023. *Archives of Toxicology* 98 (8):2441–2461. DOI: 10.1007/s00204-024-03793-4.
66. Newton K., Strasser A., Kayagaki N., Dixit V.M.. 2024. Cell death, *Cell*, Volume 187, Issue 2, Pages 235-256, ISSN 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2023.11.044.
67. Nguyen D., Osterlund E., Kale J., Andrews D.W. 2024. The C-terminal sequences of Bcl-2 family proteins mediate interactions that regulate cell death. *The Biochemical Journal* 481(14):903–922. DOI: 10.1042/BCJ20210352.
68. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Volume 1833, Issue 12, Pages 3448-3459, ISSN 0167-4889, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
69. Ostróżka A., Chajec Ł., Wilczek G., Student S., Kocot K., Homa J., Rost-Roszkowska M.M. 2024. Toxic effects of nickel on tolerance and regeneration in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *European Zoological Journal* 91(1):180–205. DOI: 10.1080/24750263.2024.2310041.
70. Ostróżka A., Tiffert Z., Wilczek G., Rost-Roszkowska M. 2022. Can insecticide-free clean water regenerate the midgut epithelium of the freshwater shrimp after dimethoate treatment? *Micron* 155:103162. DOI: 10.1016/j.micron.2021.103162.
71. Ostróżka A., Wilczek G., Tarnawska M., Student S., Rost-Roszkowska M. 2025. Relationship between different toxic effects of nickel on tolerance and recovery in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *European Zoological Journal* 92 (1):876–895. DOI: 10.1080/24750263.2025.2533312.
72. Pantaleão J.A.F., Barros-Alves S.D.P., Tropea C., Alves D.F., Negreiros-Fransozo M.L., López-Greco L.S. 2015. Nutritional vulnerability in early stages of the freshwater ornamental “Red Cherry shrimp” *Neocaridina davidi* (Caridea: Atyidae). *Journal of Crustacean Biology* 35(5):676–681. DOI: 10.1163/1937240X-00002357.
73. Park S-J, Jang J-W, Moon E-Y. 2023. Bisphenol a – induced autophagy ameliorates human B cell death through Nrf2- mediated regulation of Atg7 and Beclin1 expression by Syk activation. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 260:115061. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.115061.

74. Perin C.I., Silva P.B., da Rosa J.A. 2022. Genotoxic potential of bisphenol a: A review. *Environmental Pollution* 299:119346. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.119346.
75. Poprawa I., Chajec Ł., Chachulska-Żymelka A., Wilczek G., Student S., Leśniewska M., Rost-Roszkowska M.M. 2022. Ovaries and testes of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda) react differently to the presence of cadmium in the environment. *Scientific Reports* 12(1):6705. DOI: 10.1038/s41598-022-10664-4.
76. Ramalho-Santos J., Varum S., Amaral S., Mota P.C., Sousa A.P., Amaral A. 2009. Mitochondrial functionality in reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update* 15(5):553–572. DOI: 10.1093/humupd/dmp016.
77. Ribas V., García-Ruiz C., Fernández-Checa J. C. 2014. Glutathione and mitochondria. *Front. Pharmacol.* 5, 151. DOI: 10.3389/fphar.2014.00151.
78. Rost-Roszkowska M., Machida R., Fukui M. 2010. The role of cell death in the midgut epithelium in *Filientomon takanawanum* (Protura). *Tissue & Cell* 42(1):24–31. DOI: 10.1016/j.tice.2009.06.003.
79. Rost-Roszkowska M., Poprawa I., Chajec Ł., Chachulska-Żymelka A., Leśniewska M., Student S. 2020a. Effects of short- and long-term exposure to cadmium on salivary glands and fat body of soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda): Histology and ultrastructure. *Micron* 137:102915. DOI: 10.1016/j.micron.2020.102915.
80. Rost-Roszkowska M., Poprawa I., Chajec Ł., Chachulska-Żymelka A., Wilczek G., Wilczek P., Student S., Skowronek M., Nadgórska-Socha A., Leśniewska M. 2020b. Influence of soil contaminated with cadmium on cell death in the digestive epithelium of soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). *European Zoological Journal* 87(1):242–262. DOI: 10.1080/24750263.2020.1757168.
81. Rost-Roszkowska M., Poprawa I., Chajec Ł., Chachulska-Żymelka A., Wilczek G., Wilczek P., Tarnawska M., Student S., Leśniewska M. 2021a. Effects of cadmium on mitochondrial structure and function in different organs: Studies on the soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). *European Zoological Journal* 88(1):632–648. DOI: 10.1080/24750263.2021.1912199.
82. Rost-Roszkowska M.M., Mermer P., Chajec Ł., Sosinka A., Wilczek G., Student S., Wrońska A., Karnówka O. 2024. Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *European Zoological Journal* 91(1):213–234. DOI: 10.1080/24750263.2024.2308529.

83. Rost-Roszkowska M.M., Poprawa I., Chajec Ł., Chachulska-Żymełka A., Wilczek G., Skowronek M., Student S., Leśniewska M. 2022. Hazards related to the presence of cadmium in food – studies on the European soil centipede, *Lithobius forficatus*. Science of the Total Environment 845:157298. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.157298.
84. Rost-Roszkowska M.M., Vilimova J., Sosinka A., Skudlik J., Franzetti E. 2012. The role of autophagy in the midgut epithelium of *Eubbranchipus grubii* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). Arthropod Struct Dev. 41: 271–279. PMID: 22445350. DOI: 10.1016/j.asd.2012.01.001.
85. Rost-Roszkowska M.M., Vilimová J., Tajovský K., Šustr V., Ostrůžka A., Kaszuba F. 2021b. Structure of the midgut epithelium in four diplopod species: Histology, histochemistry and ultrastructure. Arthropod Systematics & Phylogeny 79:295–308. DOI: 10.3897/asp.79.e67022.
86. Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C., Cossarizza A. 1997. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. FEBS Lett 411(1):77–82. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)00669-8.
87. Schieber M., Chandel N.S. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr. Biol. 24, 453–462. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
88. Sinha K., Das J., Pal P.B., Sil P.C.. 2013. Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. 2013. Archives of Toxicology 87(7):1157–1180. DOI: 10.1007/s00204-013-1034-4.
89. Sonakowska L., Włodarczyk A., Poprawa I., Binkowski M., Śróbka J., Kamińska K., Kszuk-Jendryś M., Chajec Ł., Zajusz B. 2015. Structure and ultrastructure of the endodermal region of the alimentary tract in the freshwater shrimp *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca). PLoS One 10(5):e0126900. DOI: 10.1371/journal.pone.0126900.
90. Sonakowska L., Włodarczyk A., Wilczek G., Wilczek P., Student S., Rost-Roszkowska M.M., Lebedeva I.V. 2016. Cell death in the epithelia of the intestine and hepatopancreas in *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca). PLOS ONE 11(2):e0147582. DOI: 10.1371/journal.pone.0147582.
91. Sonakowska-Czajka L., Śróbka J., Ostrůžka A., Rost-Roszkowska M.M. 2021. Postembryonic development and differentiation of the midgut in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca, Decapoda) larvae. Journal of Morphology 282(1):48–65. DOI: 10.1002/jmor.21281.

92. Sousa L.G., Petriella A.M. 2001. Changes in the hepatopancreas histology of *Palaemonetes argentines* (Crustacea: Caridea) during moult. *Biocell*. 25(3): 275–281. PMID: 11813543.
93. Sousa L.G., Petriella A.M. 2006. Morphology and histology of *P. argentines* (Crustacea, Decapoda, Caridea) digestive tract. *Biocell*, 30 (2), 287-294. DOI: 10.32604/biocell.2006.30.287.
94. Srinivas U.S., Tan B.W.Q., Vellayappan B.A., Jeyasekharan A.D. 2019. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Bio*. DOI: 10.1016/j.redox.2018.101084.
95. Susiarjo M., Sasson I., Mesaros C., Bartolomei M.S. 2013. Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLOS Genet*. 9(4)e1003401. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003401.
96. Symonova R. 2007. Ultrastructure of hepatopancreas and its possible role as a hematopoietic organ in nonmarine cypridoidean ostracods (Crustacea). *Hydrobiologia*. 585: 213–223. DOI: 10.1007/s10750-007-0639-0.
97. Tropea C., Stumpf L., López Greco L.S., Thuesen E.V. 2015. Effect of temperature on biochemical composition, growth and reproduction of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina heteropoda heteropoda* (Decapoda, Caridea). *PLOS ONE* 10(3):e0119468. DOI: 10.1371/journal.pone.0119468.
98. Trzcińska M. 2003. Apoptosis – molecular mechanism of the process and selected detection methods in biology of reproduction. *Biotechnologia* 60(1):93–105.
99. Viebahn-Haensler R., León Fernández O. S. 2024. Mitochondrial dysfunction, its oxidative stress-induced pathologies and redox bioregulation through low-dose medical ozone: a systematic review. *Molecules* 29, 2738. DOI: 10.3390/molecules29122738.
100. Vijaykumar T., Singh D., Vanage G.R., Dhumal R.V., Dighe V.D. 2017. Bisphenol a – induced ultrastructural changes in the testes of common marmoset. *The Indian Journal of Medical Research* 146(1):126–137. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_927_15.
101. Vogler M., Braun Y., Smith V.M., Westhoff M.A., Pereira R.S., Pieper N.M., Anders M., Callens M., Vervliet T., Abbas M., Macip S., Schmid R., Bultynck G., Dyer M.J.S. 2025. The BCL2 family: From apoptosis mechanisms to new advances in targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 10(1):91. DOI: 10.1038/s41392-025-02176-0.
102. Warren C.F.A., Wong-Brown M.W., Bowden N.A. 2019. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death and Disease* 10(3):177. DOI: 10.1038/s41419-019-1407-6.

103. Weber S., Traunspurger W. 2016. Influence of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) on freshwater meiofaunal assemblages. *Limnologica* 59:155–161. DOI: 10.1016/j.limno.2016.06.001.
104. Włodarczyk A., Sonakowska L., Kamińska K., Marchewka A., Wilczek G., Wilczek P., Student S., Rost-Roszkowska M. 2017. The effect of starvation and re-feeding on mitochondrial potential in the midgut of *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). *PLOS ONE* 12(3):e0173563. DOI: 10.1371/journal.pone.0173563.
105. Włodarczyk A., Student S., Rost-Roszkowska M. 2019a. Autophagy and apoptosis in starved and re-fed *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) midgut. *Canadian Journal of Zoology* 97(4):294–303. DOI: 10.1139/cjz-2018-0104.
106. Włodarczyk A., Wilczek G., Wilczek P., Student S., Ostróżka A., Tarnawska M., Rost-Roszkowska M. 2019b. Relationship between ROS production, MnSOD activation and periods of fasting and re-feeding in freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). *PeerJ* 7:e7399. DOI: 10.7717/peerj.7399.
107. Xie Y., Li J., Kang R., Tang D. 2020. Interplay between lipid metabolism and autophagy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:431. DOI: 10.3389/fcell.2020.00431.
108. Yamamoto T., Yasuhara A., Shiraishi H., Nakasugi O. 2001. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere* 42(4):415–418. DOI: 10.1016/s0045-6535(00)00079-5.
109. Yao C.L., Wang A.L., Wang Z.Y., Wang W.N., Sun R.Y. 2007. Purification and partial characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from haemolymph of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture* 270(1–4):559–565. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.068.
110. Yu J., Yang C., Yu R.A., Fu G. 2007. Toxic response of dimethyl phthalate (DMP) to *Gracilaria lemaneiformis*. *Electronic Journal of Biotechnology* 3(4):80–86.
111. Zechner R., Madeo F., Kratky D. 2017. Cytosolic lipolysis and lipophagy: Two sides of the same coin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(11):671–684. DOI: 10.1038/nrm.2017.76.

V PRACE NAUKOWE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU STANOWIACEGO PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Gorol H., Ostróżka A., Wilczek G., Chajec Ł., Student S., Aleksa A., & Rost-Roszkowska M. 2025. How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 92(1), 390–409. DOI: 10.1080/24750263.2025.2463421

Gorol H., Chajec Ł., Wilczek G., Student S., Ostróżka A., Rost-Roszkowska M. 2026. Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 93:1, 563-582. DOI: 10.1080/24750263.2026.2652113

How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*

H. Gorol, A. Ostróżka, G. Wilczek, Ł. Chajec, S. Student, A. Aleksa & M. Rost-Roszkowska

To cite this article: H. Gorol, A. Ostróżka, G. Wilczek, Ł. Chajec, S. Student, A. Aleksa & M. Rost-Roszkowska (2025) How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*, The European Zoological Journal, 92:1, 390-409, DOI: [10.1080/24750263.2025.2463421](https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2463421)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2463421>



© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 20 Feb 2025.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 965



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 6 View citing articles [↗](#)



How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*

H. GOROL¹, A. OSTRÓŻKA¹, G. WILCZEK¹, Ł. CHAJEC¹, S. STUDENT^{1,2,3}, A. ALEKSA¹, & M. ROST-ROSZKOWSKA^{1,4} 

¹Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland,

²Faculty of Automatic Control, Electronics and Computer Science, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland,

³Biotechnology Center, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland, and ⁴SPIN-Lab Centre for Microscopic Studies on Matter, University of Silesia in Katowice, Chorzów, Poland

(Received 25 November 2024; accepted 23 January 2025)

Abstract

Bisphenol A (BPA) is an organic compound used in the production of numerous plastics, which poses a real threat to health and life. Although BPA is poorly soluble in water, its presence in marine and freshwater environments has been recorded at quite high levels. Numerous studies are being conducted on the impact of this xenobiotic on the population size, fertility, and reproduction of various animals. A freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea) originates from Asia and enjoys great interest among breeders and researchers studying the influence of various xenobiotics on the functioning of freshwater animals. Therefore, we selected this species to analyze the cytotoxicity of BPA and possible changes in cells leading to their protection. The study aimed to determine whether BPA only causes degenerative changes in the midgut epithelium of freshwater crustaceans or whether cell and tissue protection processes (e.g. stem cell proliferation) will be visible at the ultrastructural level. The most important goals were to establish whether the cytotoxicity of BPA is connected with its concentration and the period of animal exposure and whether it proceeds in the same manner in different organs. Thus, we used different concentrations of BPA, corresponding to its concentrations in different waters and different times of the animals' breeding in a contaminated environment. Shrimps were exposed to three concentrations of BPA: 1, 5, and 10 mg/L for 24, 48, and 72 h. Two organs that form the midgut were isolated – the intestine and hepatopancreas. The results revealed that the concentration and exposure time of freshwater animals affect the functioning of stem cells. However, autophagy and lipid digestion play an important role in protecting cells against the effects of BPA, which is also related to the increased energy demand of cells. Further studies connected with cell death processes and antioxidative mechanisms are needed.

Keywords: *Bisphenol A*, *midgut stem cells cycle*, *cycle*, *cytotoxicity*

1. Introduction

Environmental pollution is a serious ecological problem, negatively affecting humans and other living organisms, and leading to adverse consequences for natural ecosystems. Pollution of the environment can be caused by natural or artificial sources, also known as anthropogenic sources. Bisphenol A (BPA) is a substance that pollutes the environment, results from human activity, and harms the health of living organisms (Gonkowski & Makowska

2022). Bisphenols are organic compounds, phenol derivatives, which have two hydroxyphenol groups linked to each other in their structure, usually through a carbon atom. The best-known and most studied is bisphenol A (BPA) (Jurek & Leitner 2018). BPA is used to produce medical products, tableware, food packaging, plastic bottles, cookware, plastic bowls, etc. In addition, it is a component of epoxy resins that coat food cans and is used in the production of thermal paper (Björnsdotter et al.

*Correspondence: M. Rost-Roszkowska, Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, University of Silesia in Katowice, Bankowa 9, Katowice 40-007, Poland. Email: magdalena.rost-roszkowska@us.edu.pl

2017; Neri et al. 2024). BPA can be detected in soil, water, and the air of many countries in Asia, North America, and Europe. Its wide application in various industrial processes leads to the accumulation of BPA in the environment and living organisms, while its bioaccumulative potential is moderate (Corrales et al. 2015; Careghini et al. 2015). The concentration of BPA and its analogs in aquatic environments ranges from ng/l to mg/l levels (Careghini et al. 2015; Fabrello & Matozzo 2022; Fabrello et al. 2024). This means that BPA was detected in a concentration that reached hundreds of ng/L to tens of µg/L (Fabrello & Matozzo 2022). Thus, the degrees of toxicity of BPA in the aquatic environment were determined as follows: very toxic (<1 mg/L), toxic (1–10 mg/L), and harmful to aquatic organisms (10–100 mg/L) (Fabrello et al. 2024). It has been reported that BPA exhibits trophic transfer (Lee et al. 2015; Li et al. 2021). BPA will accumulate in their various organs after entering the body of small aquatic organisms (through the digestive system or body covering (Corrales et al. 2015; Li et al. 2018). These animals, being one of the links in the trophic chain, will be food for other animals, and BPA will consequently be transferred to their body.

BPA enters the organisms of freshwater animals through the epidermis, gills, and the digestive system with food. The toxin is then distributed via the body fluids (blood/lymph/hemolymph), throughout the body (Careghini et al. 2015, Nayak et al. 2022). Properly functioning organs regulate the assimilation of molecules necessary for metabolic changes, and various pathways of epithelial cell degradation defend against the accumulation of xenobiotics in the body. Changes occurring under the influence of stressors may change the homeostasis of organisms (Rost-Roszkowska et al. 2010). For this reason, living organisms have several mechanisms responsible for protecting against toxic substances (Rost-Roszkowska et al. 2018, 2019, 2020).

Some organs are essential in maintaining the body's homeostasis, one of which is the middle region of the digestive system – the midgut (Malagoli et al. 2010; Rost-Roszkowska et al. 2021, 2022). In invertebrates, it has a simple structure, is not covered with a cuticle, and is responsible for the synthesis and secretion of many enzymes and hormones, intracellular digestion, absorption of digestive products, and storage of reserve substances. In Crustacea, e.g., Malacostraca, the midgut can be formed by the tube-shaped intestine and different glands, e.g., hepatopancreas (Sonakowska et al. 2015). Research has shown that these animals are susceptible to the effects and occurrence of toxic

BPA in the environment. Studies on this subject conducted on freshwater animals have considered only selected organ changes, while a holistic point of view is lacking (Canesi & Fabbri 2015). Numerous stressors will trigger cell death processes, e.g., apoptosis, necrosis, or autophagy, which in many cases can act as a survival factor for cells or tissues (Franzetti et al. 2012; Bednarska & Świątek 2016; Rost-Roszkowska et al. 2022; Ostróżka et al. 2024). The relationships between these processes are currently being intensively analyzed worldwide, but there remains a need for further analysis not only at the level of tissues or cells but also of cell organelles, their structures, and functions.

The freshwater shrimp, *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca), was selected as the research object. This species is native to Asia, but its presence has been noted in European rivers such as the Odra (Jabłońska et al. 2018). It is very popular with breeders all over the world. It is characterized by a simple body structure, high fertility, and is easy to breed – characteristics that have long ensured its interest to scientists (Sonakowska et al. 2015; Sonakowska-Czajka et al. 2021). Like most crustaceans, *N. davidi* plays a key role in the aquatic ecosystem (Weber & Traunspurger 2016). Accumulation of various xenobiotics in different organs of such organisms may affect the subsequent links of the trophic chains. Thus, this species is of interest in toxicological studies (Tropea et al. 2015; Pantaleão et al. 2015; Włodarczyk et al. 2017; Włodarczyk, Student et al. 2019, Włodarczyk, Wilczek et al. 2019; Ostróżka et al. 2022, 2024). The assessment of the toxicity of BPA and its derivatives most often involves the analysis of population size, reproduction, and fertility, and among freshwater invertebrates, it most often concerns molluscs, crustaceans, and nematodes (Canesi et al. 2005; Crain et al. 2007; Fabbri et al. 2014; Canesi & Fabbri 2015; Siracusa et al. 2018). However, there is a paucity of data on cytotoxic effects, i.e., changes in cells at the ultrastructural level, activation of cell death processes, or even activation of cell and tissue protection processes. Thus, in our study, we aimed to determine whether BPA only causes degenerative changes in intestinal and hepatopancreatic cells of freshwater crustaceans or whether cell and tissue protection processes will be visible at the ultrastructural level. We additionally aimed to analyze changes in the cell cycle or the proliferative capacity of midgut epithelial stem cells of this species. The most important goals were to establish whether the cytotoxicity of BPA is connected with its concentration and the period of animal exposure and whether it proceeds in the same manner in different organs. In our research, we used different

concentrations of BPA and different times of the animals' breeding in a contaminated environment. Many experiments connected with BPA were conducted with concentrations ranging from 1 to 50 mg/L (Esperanza et al. 2020; Chen et al. 2021). 1 mg/L of BPA can be found in a freshwater environment (Lee et al. 2003; Umar et al. 2013). 5 and 10 mg/L are high concentrations that are not usually found in the environment, but within the ranges described for the freshwater (Yamamoto et al. 2001; Fabrello & Matozzo 2022).

2. Materials and methods

2.1. Material

The research material consisted of mature individuals (males and females) of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca), obtained from local shrimp breeders and kept in a 105 L aquarium equipped with a mechanical filtration system and a heater with a thermostat. The water temperature was set at 21°C, pH = 7, and water hardness (GH) = 10. Conditions were created to resemble the animals' natural habitat. The individuals were fed *ad libitum* with JBL Novo Prawn food (Ostróžka et al. 2024). This culture was provided continuously throughout the experiment.

2.2. Experiment

The concentrations and experimental times for each experimental group were selected based on the literature concerning similar experiments conducted on freshwater crustaceans (Castritsi-Catharios et al. 2013; Gerhardt 2019). BPA is detected in higher concentrations in landfill leachates and may occur at concentrations up to 10 mg/L (Yamamoto et al. 2001; Lee et al. 2003; Fabrello & Matozzo 2022). Based on the literature data, three concentrations were established and were used to determine the research groups (Lee et al. 2003). Thus, shrimps selected from laboratory culture were exposed to three concentrations of BPA: 1 mg/L, 5 mg/L, and 10 mg/L for 24, 48, and 72 h (Table I) obtained due to using a sonicator.

Animals of experimental groups were kept separately in 0.5-liter containers (1 individual per container). The water temperature was set at 21°C, pH = 7, and water hardness (GH) = 10. The individuals were fed *ad libitum* with JBL Novo Prawn food as the control group. Animals were cultured at the above concentrations for 24, 48, and 72 hours. Excrements were removed from the bottom every 12 h. The control and experimental groups were cultured continuously to provide research material for all methods used. However, water was prepared fresh for each specimen each time. Five specimens of each group were selected for performing each method described below ($n = 5$). Two organs that form the midgut were isolated – intestine and hepatopancreas – so we obtained several experimental groups, as presented in Table I. Individuals from continuous culture in uncontaminated water were considered as the control group.

During the experiment, shrimp were bred separately in plastic containers to eliminate the effects of competition between individuals. All individuals, both from the control group and from the research groups, were fed *ad libitum*. The animals were anesthetized with chloroform before sectioning and isolating the intestine and hepatopancreas. As our previous studies on *N. davidi* revealed that no changes appeared between males and females when animals were exposed to different stressors (Włodarczyk et al. 2017; Włodarczyk, Student et al. 2019; Włodarczyk, Wilczek et al. 2019; Ostróžka et al. 2022, 2024), the studies were conducted independently on the sexes. The experimental design is shown in Figure 1.

2.3. Methods

2.3.1. Light microscope and histochemistry. Isolated organs (intestine and hepatopancreas) were fixed in 2.5% glutaraldehyde (2 h, room temperature (RT)) and 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer (2 h, 4 °C) and prepared according to standard methods for analysis using transmission electron microscopy (TEM) (Sonakowska et al. 2015; Sonakowska-Czajka et al. 2021). Epoxy resin blocks were cut on a Leica Ultracut UCT25 microtome. The semi-thin

Table I. Experimental groups of adult specimens of *N. davidi*. In – intestine, H – hepatopancreas, C – control.

BPA concentration/ Period	Intestine			Hepatopancreas		
	24h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0 mg/L	–	–	CIn	–	–	CH
1 mg/L	1In24	1In48	1In72	1H24	1H48	1H72
5 mg/L	5In24	5In48	5In72	5H24	5H48	5H72
10 mg/L	10In24	10In48	10In72	10H24	10H48	10H72

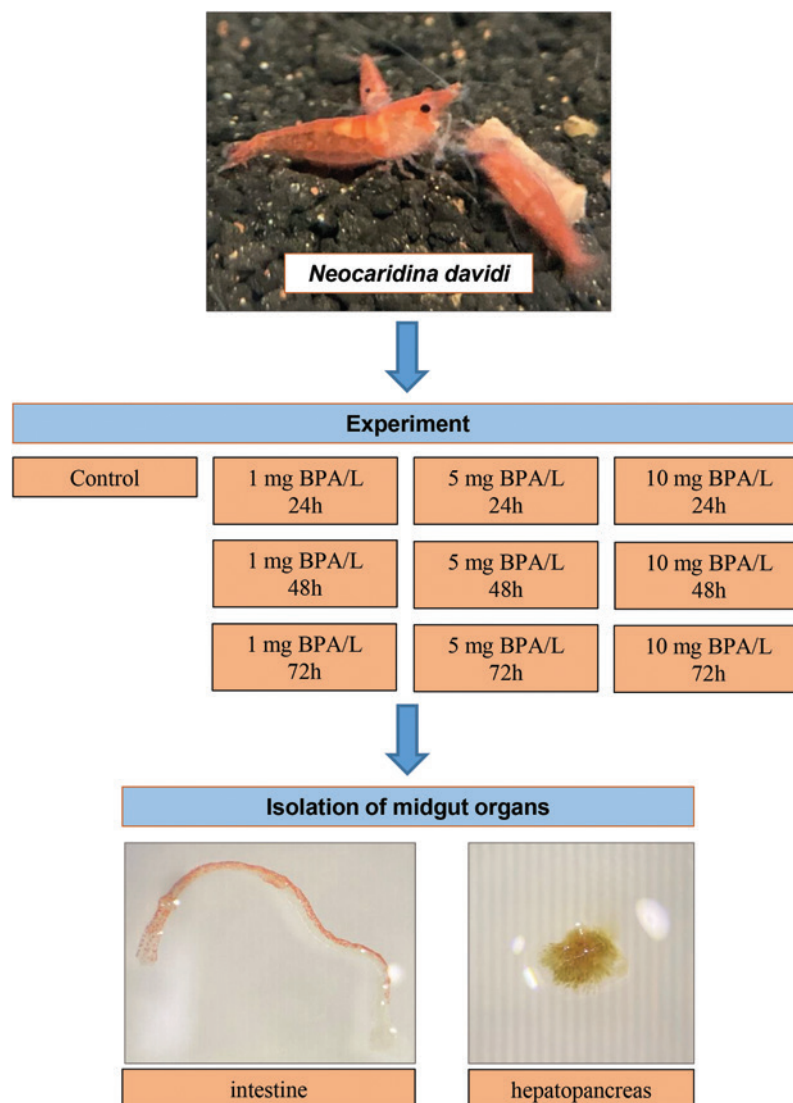


Figure 1. Scheme of experimental setup on *N. davidi* exposed to BPA.

sections obtained (0.8 μm thick) were stained with 1% methylene blue in 0.5% borax (for visualization of the tissue topography). Semi-thin sections were stained with Schiff's reagent (polysaccharide staining) and bromophenol blue (BPB, protein staining) according to the protocol described for *N. davidi* (Sonakowska et al. 2015; Ostróčka et al. 2022) and analyzed using the OLYMPUS B×60light microscope.

2.3.2. Transmission electron microscopy. Ultrathin sections (70 nm thick) were cut on a Leica Ultracut EM UC7 RT ultramicrotome, and were transferred to copper grids and contrasted with uranyl acetate and lead citrate (Sonakowska et al. 2015, 2016). The material was analyzed in a Hitachi H500 and Quanta FEG250 electron microscopes.

2.3.3. Qualitative analysis – confocal microscopy.

2.3.3.1. LysoTracker Red staining. LysoTracker Red is commonly used for detecting strongly acidic organelles (e.g., lysosomes, autolysosomes). The dissected intestine and hepatopancreas of adult specimens of *N. davidi* from all experimental groups were incubated in 2.5 mmol/L LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, L 7528; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI (Sigma-Aldrich), as described by Poprawa et al. (2022). The organs were observed using an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope using a 559 nm laser for LysoTracker Red and a 405 nm laser for the DAPI dye, resulting in blue fluorescence of nuclei and red fluorescence of strongly acid structures.

2.3.3.2. BODIPY lipid probes. BODIPY (4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indacene) fluorophore incorporates natural lipids. Isolated organs without fixation were stained with 20 µl/ml BODIPY working solution (30 min, RT, in the dark) prepared from BODIPY stock according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes). After washing with TBS, the material was stained with DAPI solution (1 µg/ml, 30 min, RT, in the dark). Organs were examined using an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope and argon lasers: 405 nm laser (detection of DAPI) and 559 nm resulting in blue fluorescence of nuclei and green fluorescence of lipids (Rost-Roszkowska et al. 2024).

2.3.4. Quantitative analysis. Intestines and hepatopancreas isolated from adult individuals of all experimental groups were homogenized in cold PBS (Phosphate buffered saline) (pH 7.4) using a mechanical homogenizer (BEAD BUG MICROTUBE HOMOGENIZER) to perform quantitative analyses. The cell suspension was washed by centrifugation at 1500 rpm for 5 min, and the pellet was suspended in 100 µl of PBS (Rost-Roszkowska et al. 2020).

2.3.4.1. MUSE Cell Cycle Kit. The Muse Cell Cycle Kit enables quantitative measurements of the percentage of cells in different cell cycle phases: G0/G1, S, G2/M. Isolated organs were prepared for analysis using a MUSE cytometer according to the protocol recommended on the manufacturer's website (<https://www.luminexcorp.com/muse-cell-cycle-kit/#overview>): fixed in 70% ethanol (24 h, on ice), washed in PBS buffer, incubated in Muse Cell Cycle Reagent (30 minutes, RT, in the dark) and analyzed on a MUSE cytometer.

2.3.4.2. MUSE Ki67 Proliferation Kit. The Muse Ki67 Proliferation Kit enables quantitative measurements of the percentage of proliferating (Ki67+) and non-proliferating (Ki67-) cells based on Ki67 protein expression. Isolated organs were prepared without fixation according to the protocol for this kit (<https://www.luminexcorp.com/muse-ki67-proliferation-kit/#overview>) and then analyzed using a MUSE cytometer.

2.3.5. Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the STATISTICA 13.1 software package. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. The data were tested for homogeneity of variance using Levene's test for equality of error variances. To assess the significance of differences in the levels of analyzed parameters with respect to the organ, concentrations of BPA and exposure

periods to BPA among the experimental groups, the method of one-way and multi-way analysis of variance (ANOVA/MANOVA). The significance of differences in the levels of analyzed quantitative parameters among experimental groups within the investigated organs and periods of BPA exposure was assessed using the Tukey test ($p < 0.05$) (Ostróžka et al. 2024).

3. Results

3.1. Changes in the midgut epithelium of *N. davidi* at the ultrastructural level caused by the presence of BPA in the environment

3.1.1. Intestine. The intestinal epithelium of control animals (CIn) comprised two types of cells: D-cells (digestive cells) and E-cells (embryonic, regenerative cells). Cylindrical in shape, D-cells lay on a noncellular basal lamina and had distinct regionalization in the arrangement of cell organelles. Thus, we could distinguish three regions of the cytoplasm: basal, perinuclear, and apical. Both the basal cytoplasm (Figure 2(a)) and the perinuclear cytoplasm were rich in cisternae of the rough (RER) and smooth (SER) endoplasmic reticulum and Golgi complexes. The apical cytoplasm (Figure 2(b)) had numerous mitochondria, cisternae of RER and SER, electron-dense granules, and vesicles with various electron densities. The exact structure of the intestine and its cells has been described (Sonakowska et al. 2015; Sonakowska-Czajka et al. 2021; Ostróžka et al. 2022).

In the 1In24 group, no changes in the ultrastructure of the cytoplasm were observed. However, vacuoles with an electron-lucent interior appeared (Figure 2(c)). The 1In48 group was characterized by a similar structure (Figures 2(d-e)) additionally, numerous distended RER cisternae and single, degenerated mitochondria appeared (Figure 2(e)). After 72 h, the number of vacuoles with electron-lucent content and degenerated mitochondria increased, while the cisternae of RER, SER, and Golgi complexes had a normal structure (Figure 2(f)). In the 5In24 and 5In48 groups, numerous degenerating mitochondria and single distended cisternae of the RER, SER or Golgi complexes were detected throughout the cytoplasm (Figures 2(g-j)). Electron-dense structures were noted in the perinuclear and basal cytoplasm (Figures 2(g,j)). However, after 72 hours of life of the animals in water contaminated with 5 mg/l of BPA, the cytoplasm of D-cells showed normal ultrastructure (Figure 2(k)). Growing shrimp in water with BPA at a concentration of 10 mg/l for 24, 48,

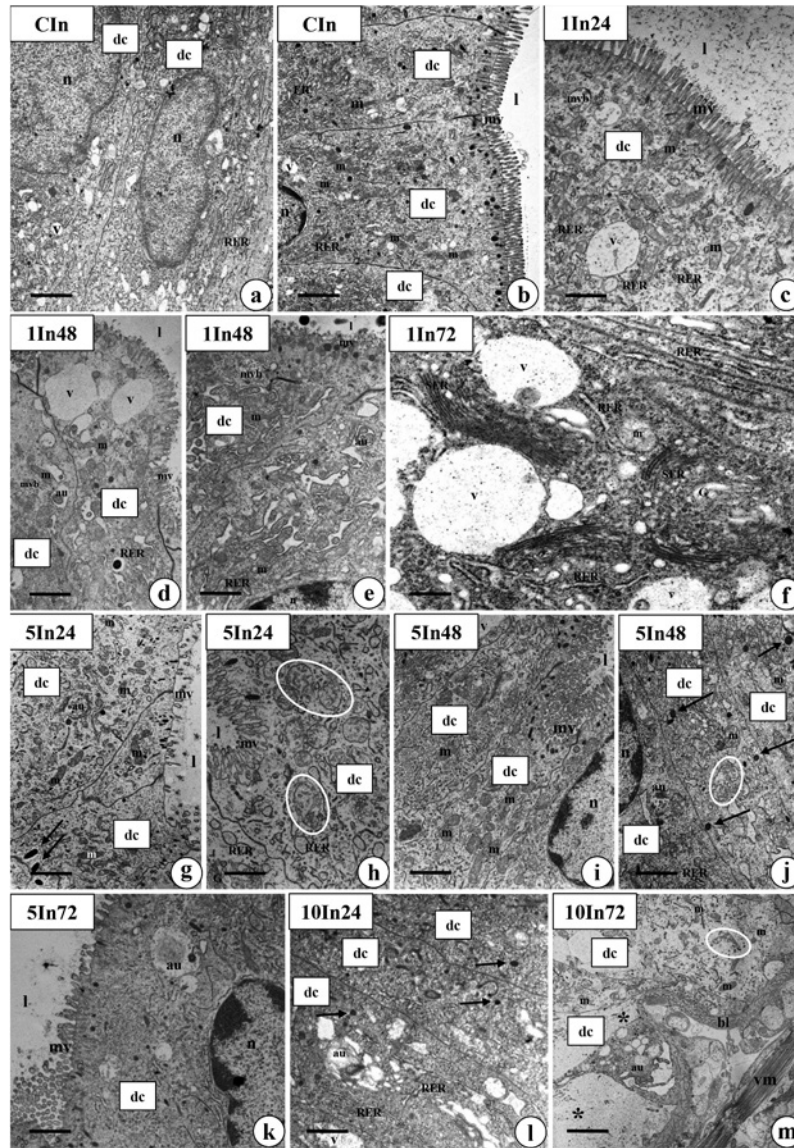


Figure 2. Intestine in *N. davidi* exposed to different BPA concentrations. Experimental groups described in Methodology. D-cells (dc), nuclei (n), mitochondria (m), cisternae of RER (RER) and SER (SER), microvilli (mv), autophagic structures (au), intestine lumen (l), vacuoles (v), multivesicular bodies (mvb), electron-dense structures (black arrows), Golgi complexes (G), degenerated mitochondria (white circle), visceral muscles (vm), necrotic cytoplasm (stars). TEM. (a) Scale bar = 1.3 μ m. (b) Scale bar = 1.6 μ m. (c) Scale bar = 1.1 μ m. (d) Scale bar = 1.2 μ m. (e) Scale bar = 1.3 μ m. (f) Scale bar = 0.4 μ m. (g) Scale bar = 1.7 μ m. (h) Scale bar = 1 μ m. (i) Scale bar = 1.1 μ m. (j) Scale bar = 1.3 μ m. (k) Scale bar = 1 μ m. (l) Scale bar = 0.8 μ m. (m) Scale bar = 1.9 μ m.

and 72 hours induced numerous degenerative changes in the intestinal epithelium. Thus, distended cisternae of the RER, SER, Golgi complexes, mitochondria, and numerous vacuoles with electron-lucent interiors occurred in the apical and perinuclear cytoplasm (Figures. 2(l-m)). Additionally, in the intestinal epithelial cells of individuals from the 10In72 group, the entire basal cytoplasm was characterized by extensive degenerative changes (necrosis) (Figure 2(m)).

3.1.2. Hepatopancreas. The proximal region of the hepatopancreatic tubules of control (CH) individuals consisted of several types of cells: R-cells, F-cells, and B-cells. R (resorptive) cells are characterized by a cytoplasm rich in Golgi complexes, cisternae of RER and SER, mitochondria, and vesicles of medium electron density (located mainly in the apical cytoplasm). F cells (fibrillar) are devoid of reserve materials but have well-developed cisternae of RER and Golgi complexes. B cells (storage cells) have

a cytoplasm rich in free ribosomes, vacuoles of various sizes, mitochondria, and spheres of storage material (Figures 3(a-b)). The detailed ultrastructure of hepatopancreatic cells has been described in *N. davidi* (Sonakowska et al. 2015; Sonakowska-Czajka et al. 2021).

In groups 1H24, 1H48, and 1H72 (Figure 3(c-i)), no changes in the structure of hepatopancreatic cells were observed. However, degenerated mitochondria could be distinguished in the cytoplasm of R and F cells, and a slightly smaller number of spheres with storage material was distinguished in B cells (Figure 3(c,f,h)).

In groups 5H24 and 5H48, no changes in the structure of R and F cells were observed (Figure 4(a-d,f)).

However, the cytoplasm of B cells became electron lucent, and spheres of the storage material were observed (Figure 4(c-e)). In turn, in the 5H72 group, no changes were detected in the ultrastructure of the F cells (not shown). In contrast, the R cells were characterized by an electron-lucent cytoplasm and the presence of degenerated mitochondria (Figure 4(g-h)). B cells' cytoplasm resembled the 5H24 and 5H48 groups (Figure 4(h)). In individuals cultured in water with BPA at a concentration of 10 mg/l for 24 h (group 10H24), R cells had numerous large vacuoles with an electron-lucent interior, numerous degenerated mitochondria, and distended RER or Golgi cisternae (Figure 5(a-b)). In many B cells, the storage material was digested (Figure 5(a)), mitochondria

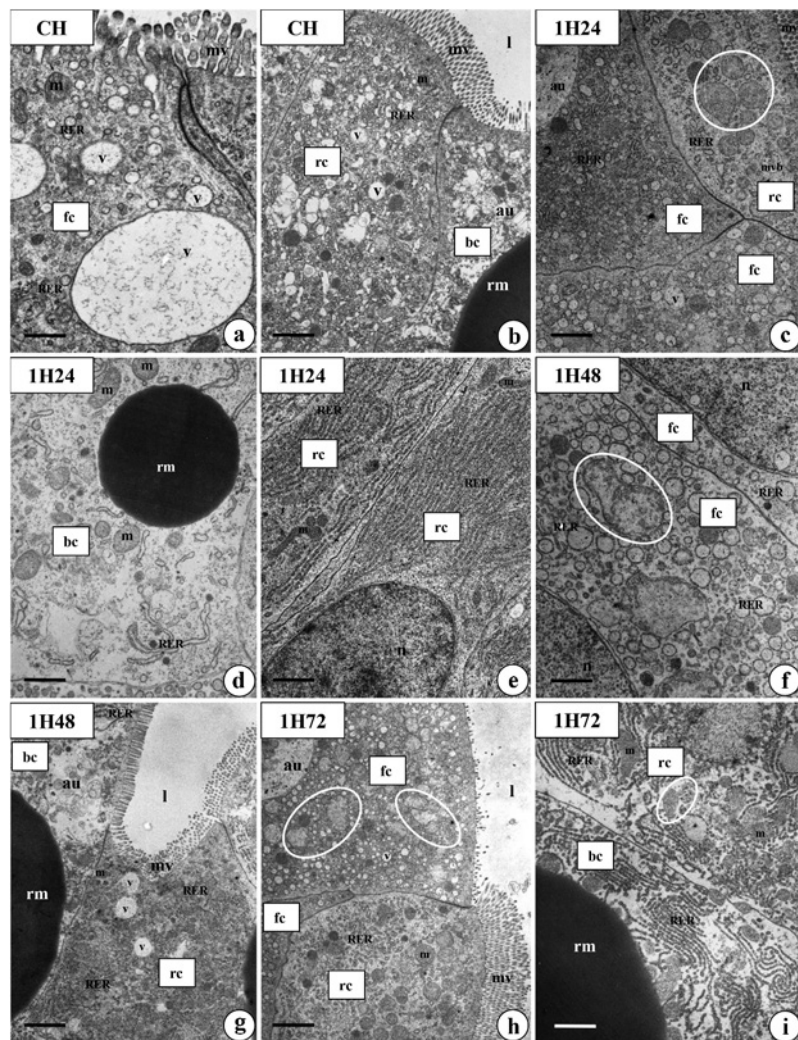


Figure 3. Hepatopancreas in *N. davidi* exposed to different BPA concentrations. Experimental groups described in Methodology. Storage cells (bc), fibrillar cells (fc), resorptive cells (rc), nuclei (n), mitochondria (m), cisterns of RER (RER), microvilli (mv), reserve materials (rm), autophagic structures (au), lumen (l), vacuoles (v), multivesicular bodies (mvb), degenerated mitochondria (white circles). TEM. (a) Scale bar = 0.6 μ m. (b) Scale bar = 1.4 μ m. (c) Scale bar = 1.3 μ m. (d) Scale bar = 1.2 μ m. (e) Scale bar = 1.1 μ m. (f) Scale bar = 0.8 μ m. (g) Scale bar = 1.8 μ m. (h) Scale bar = 1.8 μ m. (i) Scale bar = 1.3 μ m.

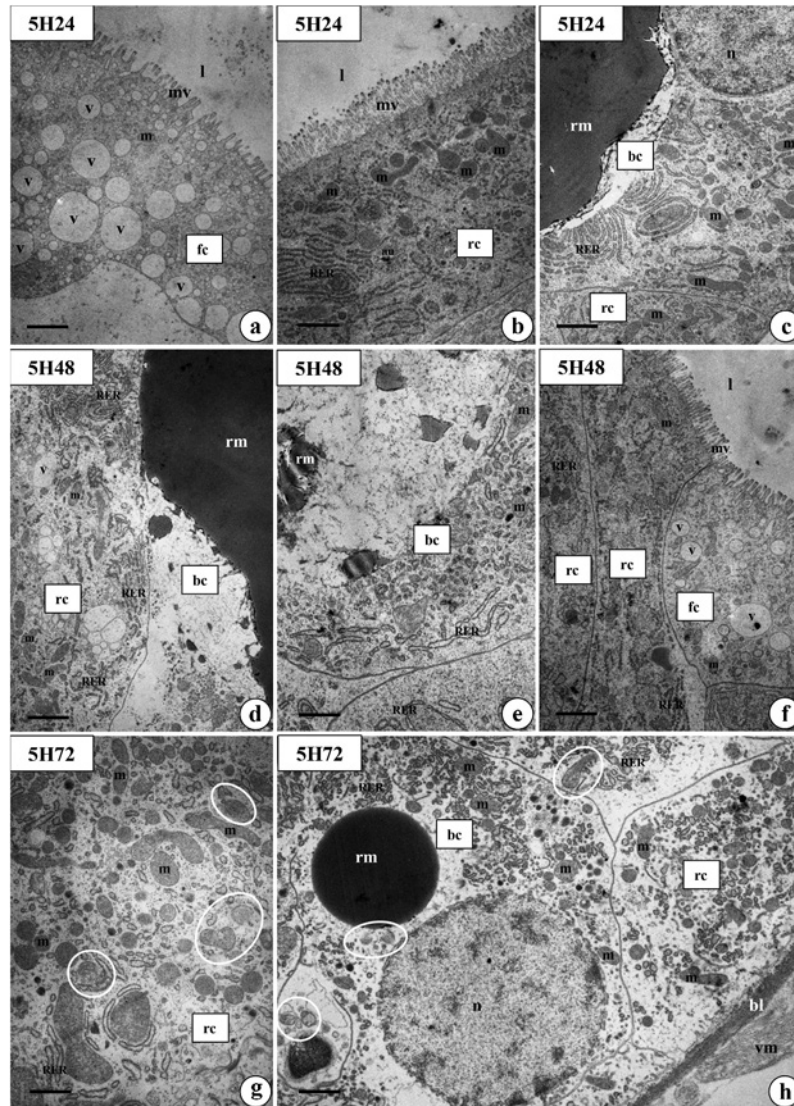


Figure 4. Hepatopancreas in *N. davidi* exposed to different BPA concentrations. Experimental groups described in Methodology. Storage cells (bc), fibrillar cells (fc), resorptive cells (rc), nuclei (n), mitochondria (m), cisterns of RER (RER), microvilli (mv), reserve materials (rm), autophagic structures (au), lumen (l), vacuoles (v), degenerated mitochondria (white circles), basal lamina (bl), visceral muscles (vm). TEM. (a) Scale bar = 2.2 μm . (b) Scale bar = 2 μm . (c) Scale bar = 1.6 μm . (d) Scale bar = 1.8 μm . (e) Scale bar = 1 μm . (f) Scale bar = 1.5 μm . (g) Scale bar = 2.4 μm . (h) Scale bar = 1.1 μm .

degenerated, and the cytoplasm, poor in organelles, being electron-lucent, showed necrotic features (Figure 5(c)). No ultrastructural changes were observed in F cells. In the case of shrimp cultured in water at this concentration for 48 h (10H48), degenerated mitochondria, strong vacuolization, and autophagy appeared in the cytoplasm of all cell types. Additionally, the storage material in B cells was digested (Figure 5(d-e)). Extending the time to 72 hours induced severe vacuolization, autophagy, and organelle degeneration in all types of hepatopancreatic cells (Figure 5(f-h)).

3.2. Autophagy in *N. davidi* midgut epithelium after BPA exposure

In the case of the intestine, in groups 1In24 and 1In48, the intensity of signals originating from strongly acidic organelles increased with increasing exposure time to BPA, but decreased after 72 h. However, in the groups, 5In24, 5In48, 5In72, and 10In24, 10In48, and 10In72, the intensity of signals originating from strongly acidic structures increased with increasing exposure time to BPA within each concentration. Analyzing the relationship between concentration and signals coming from strongly

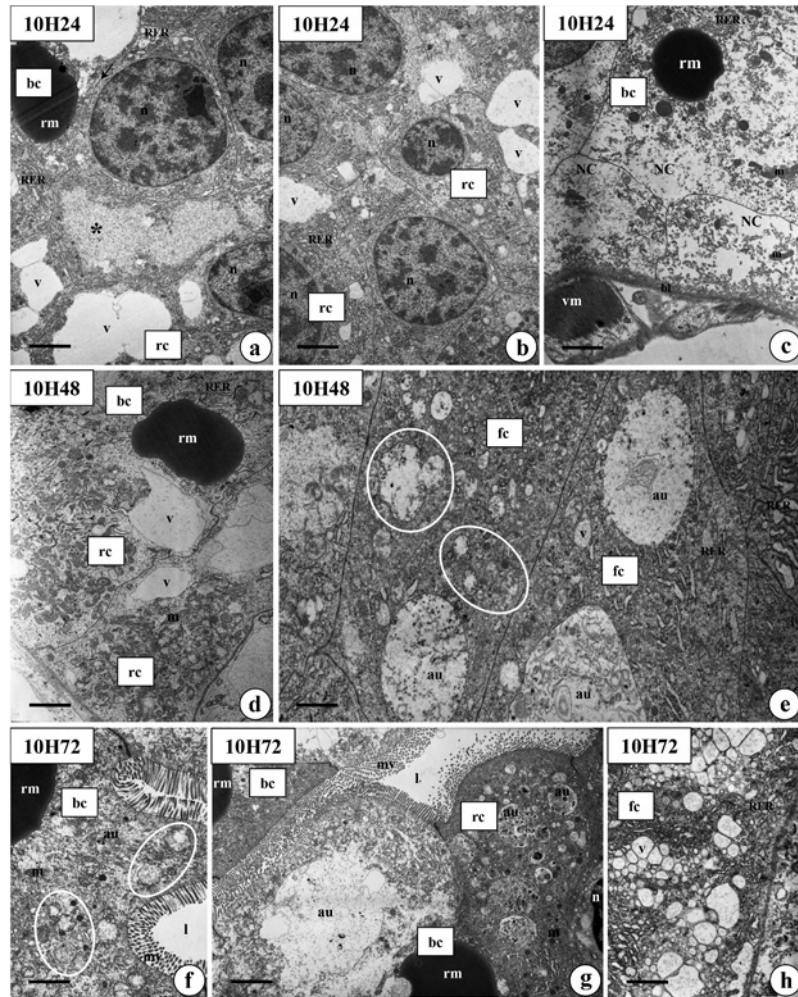


Figure 5. Hepatopancreas in *N. davidi* exposed to different BPA concentrations. Experimental groups described in Methodology. Storage cells (bc), fibrillar cells (fc), resorptive cells (rc), nuclei (n), mitochondria (m), cisterns of RER (RER), microvilli (mv), lumen (l), basal lamina (bl), visceral muscles (vm), autophagic structures (au), necrotic cells (NC), vacuoles (v), reserve materials (rm), digested reserve material (star), degenerated mitochondria (white circles), necrotic cytoplasm (stars). TEM. (a) Scale bar = 1.8 μ m. (b) Scale bar = 1.6 μ m. (c) Scale bar = 1.8 μ m. (d) Scale bar = 1.8 μ m. (e) Scale bar = 1.2 μ m. (f) Scale bar = 1.8 μ m. (g) Scale bar = 1.6 μ m. (h) Scale bar = 1.2 μ m.

acidic structures within each time of exposure of animals to the xenobiotic, it was observed that the intensity of the signal increased with increasing BPA concentration (Figure 6). In the case of the shrimp hepatopancreas, the intensity of signals emitted by strongly acidic structures in all study groups increased with increasing BPA concentration and with increasing BPA exposure time (Figure 7). Transmission electron microscopy (autophagic structures) confirmed the results obtained with the LysoTracker Red reagent.

3.3. Reserve materials in the intestine and hepatopancreas of *N. davidi*

No signals originating from lipids were observed in the intestine of the control group (CIn). Their occurrence was observed in the 5In24, 5In48, and 10In24 groups (Figure 8). This coincides with the occurrence of electron-dense structures in the perinuclear and basal cytoplasm of D-cells (Figure 2(g,j,l)). In the hepatopancreas, throughout the entire proximal part of the tubules, decreasing strength of lipid signals was observed with increasing BPA concentration and BPA

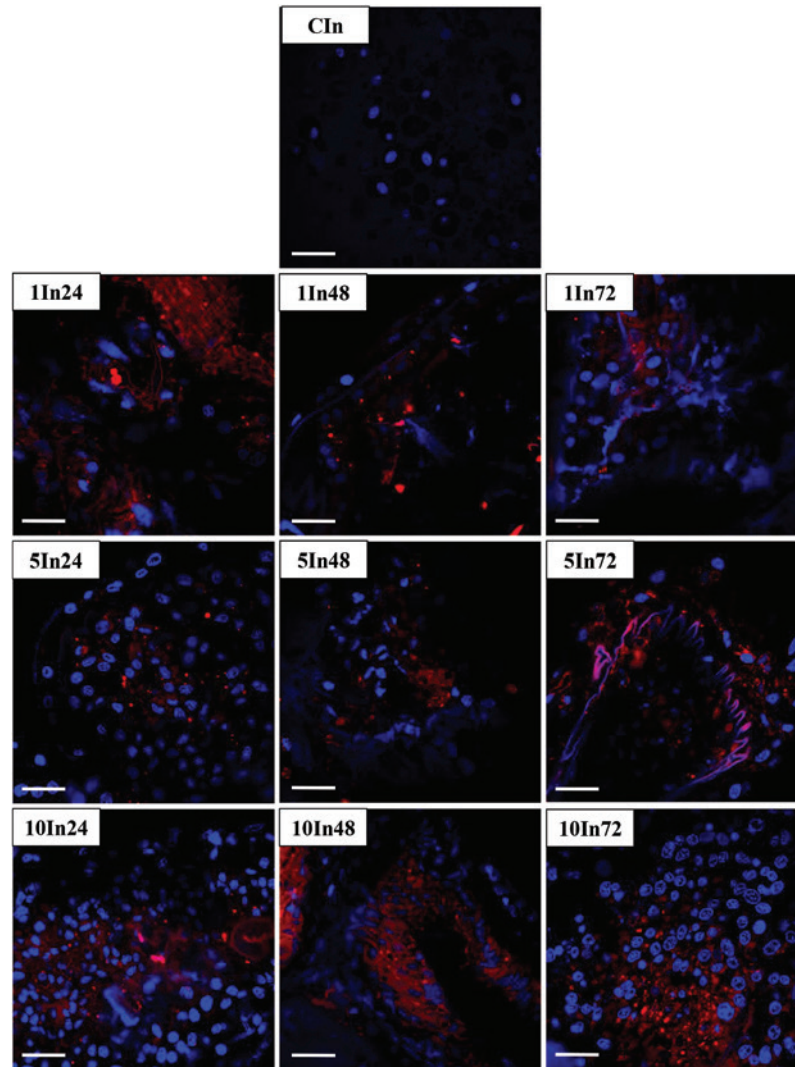


Figure 6. 3D representation of LysoTracker Red and DAPI staining of *N. davidi* intestine. BPA exposure. Confocal microscopy shows red (strongly acid structures) and blue signals (nuclei). Scale bars = 45 μ m.

exposure time (Figure 8). The remaining reserve material accumulated in the cytoplasm of intestinal and hepatopancreatic cells is presented in Table II.

3.4. Regenerative cells in the intestine and hepatopancreas of *N. davidi*

E-cells are located between the basal regions of D-cells in the anterior intestine and have no contact with the lumen of the organ. They are also located in the distal regions of the hepatopancreatic tubules. The exact ultrastructure of these cells in *N. davidi* midgut epithelium has been previously described (Sonakowska et al. 2015; Sonakowska-Czajka et al. 2021; Ostróžka et al. 2022). Division of these cells in both organs was observed in all control and experimental groups (Figure 9(a)). No alterations

were detected in the cytoplasm of E-cells in all experimental groups except the intestine from animals in the 10In48 and 10In72 groups. Distended Golgi complexes, vacuoles with an electron-lucent interior, and degenerated mitochondria appeared (Figure 9(b)).

3.5. The quantitative changes of selected parameters in the intestine and hepatopancreas of *N. davidi*

Among the defined grouping variables — organ, concentrations of BPA, and periods of BPA exposure — the second had the greatest influence on the differences observed between similarly treated groups of shrimp. The significance of periods of BPA exposure was confirmed in relation to quantitative changes in cells across the phases G0/G1 and

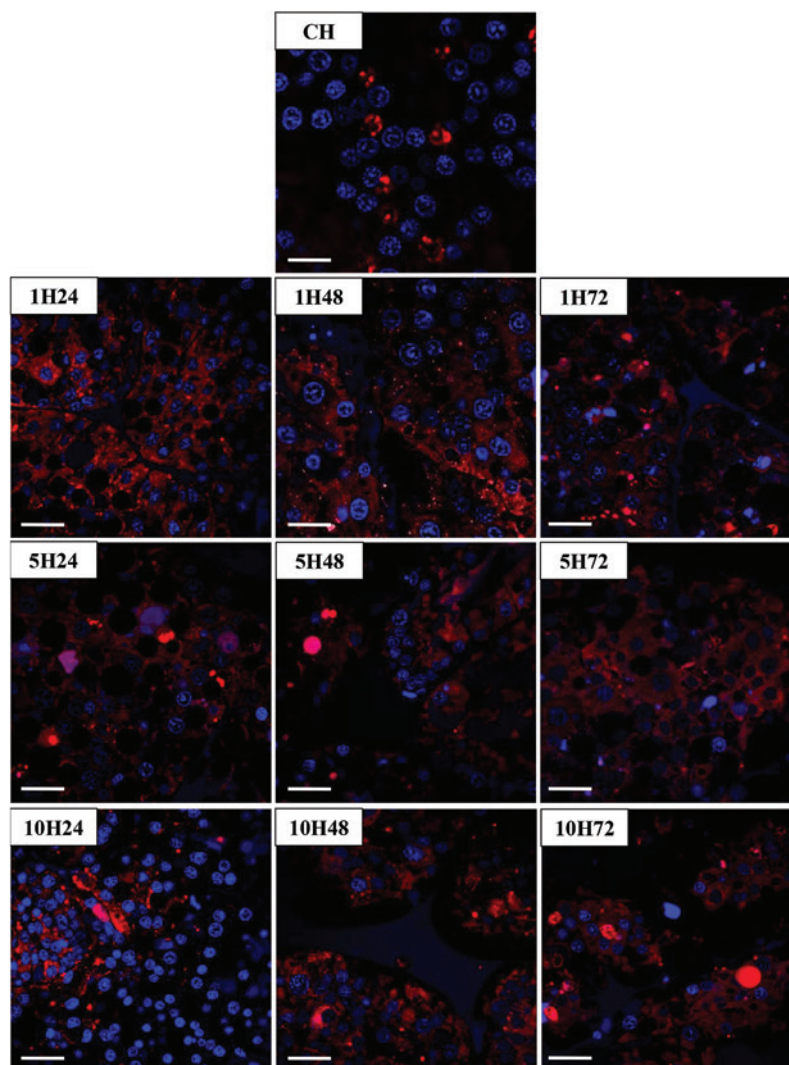


Figure 7. 3D representation of LysoTracker Red and DAPI staining of *N. davidi* hepatopancreas. BPA exposure. Confocal microscopy shows red (strongly acid structures) and blue signals (nuclei). Scale bars = 40 μm .

G2/M, as well as in Ki67-positive cells. The organ variable was significant in cases involving quantitative changes in Ki67-positive cells and cells in the S phase. Furthermore, the combined effect of all grouping variables was demonstrated with respect to both quantitative changes in cell cycle parameters and variations in the populations of Ki67-positive cells (Table III).

3.5.1. Ki67-positive cells. Regardless of the bisphenol concentration and the time of exposure to this compound, the average percentage of Ki67-positive cells in the intestine of the individuals was higher than in the hepatopancreas. In the intestines of individuals exposed to bisphenol at concentrations of 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ and 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, the percentage of Ki67-positive cells was significantly lower than in the control after

24 hours ($F(1, 8) = 8.93$, $p = 0.017$ and $F(1, 8) = 196.5$, $p = 0.0002$, respectively) and 48 hours ($F(1, 8) = 197.8$, $p = 0.0002$ and $F(1, 8) = 312.2$, $p = 0.000001$, respectively). After 72 hours, no changes in the percentage of Ki67-positive cells were recorded compared to the control. Only in the case of individuals exposed to bisphenol at a concentration of 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, the percentage of Ki67-positive cells was nearly twice as low as in the control, regardless of the exposure time (24 h: $F(1, 8) = 134.8$, $p = 0.0004$; 48 h: $F(1, 8) = 419.3$, $p = 0.000002$; 72 h: $F(1, 8) = 419.3$, $p = 0.00001$). At the specified concentrations of bisphenol, no changes in the percentage of Ki67-positive cells were recorded compared to the control after 72 hours. Only in the case of individuals exposed to bisphenol at a concentration of 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ for 24

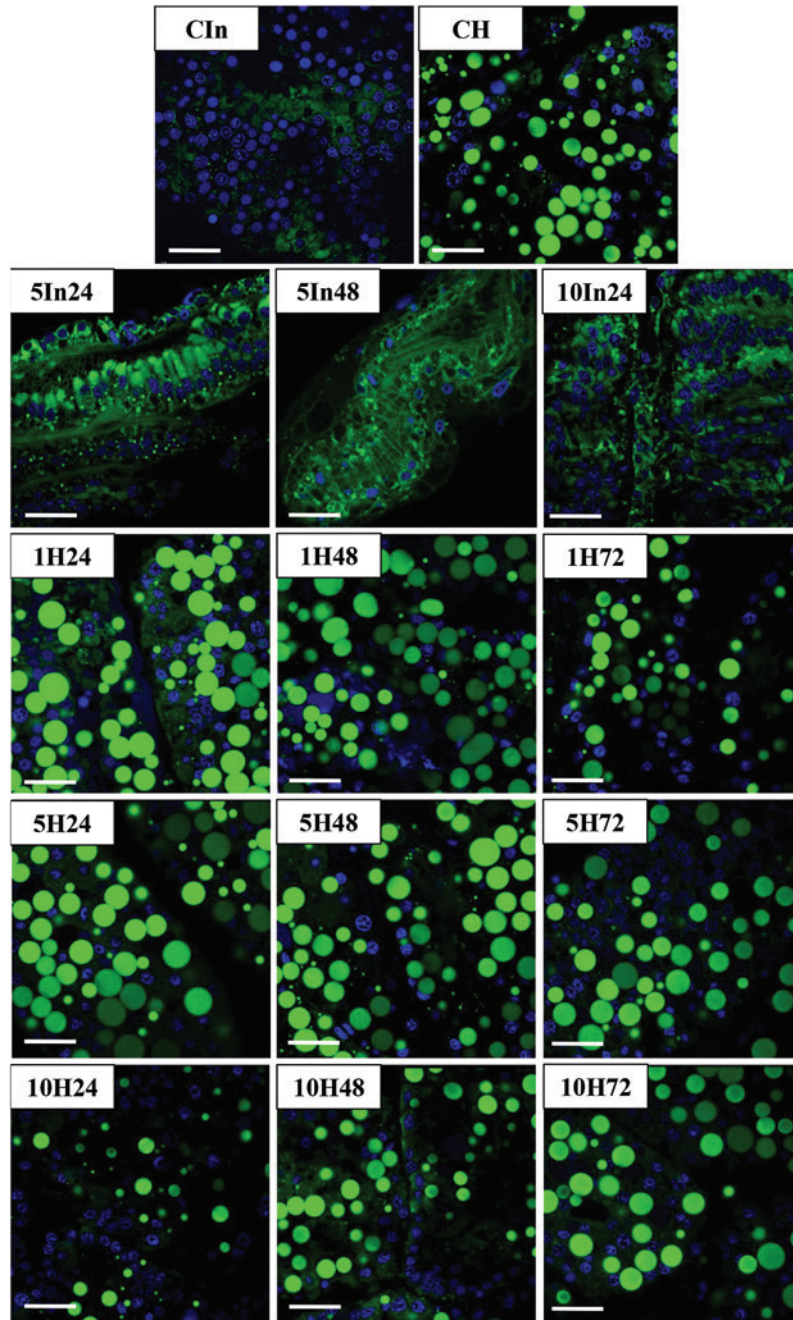


Figure 8. 3D representation of BODIPY and DAPI staining of *N. davidi* intestine and hepatopancreas. BPA exposure. Confocal microscopy shows green (lipids accumulation) and blue signals (nuclei). Scale bars = 40 μm .

hours, the percentage of Ki67-positive cells in the hepatopancreas was nearly twice as high as in the other groups. However, statistically significant differences were observed between 24 and 48 hours of exposure ($F(1, 9) = 37.04$, $p = 0.0004$). (Figure 9(c))

3.5.2. Cell cycle disorders in the intestine and hepatopancreas of *N. davidi*.

3.5.2.1. G0/G1 phase. Regardless of the exposure time, bisphenol at a concentration of $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ caused a significant reduction in the percentage of cells in the G0/G1 phase in the intestine compared to the control (24 h: $F(1, 8) = 1049.0$, $p = 0.000001$; 48 h: $F(1, 8) = 1123.0$, $p = 0.000001$; 72 h: $F(1, 8) = 80.4$, $p = 0.0002$). The effects of lower concentrations of this compound were weaker. Bisphenol at a concentration of $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ caused a significant

Table II. Proteins and polysaccharides accumulated in the cytoplasm of the midgut epithelial cells in *N. davidi*.

Intestine										
	CIn	1In24	1In48	1In72	5In24	5In48	5In72	10In24	10In48	10In72
Polysaccharides	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Proteins	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Hepatopancreas										
	CH	1H24	1H48	1H72	5H24	5H48	5H72	10H24	10H48	10H72
Polysaccharides	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Proteins	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

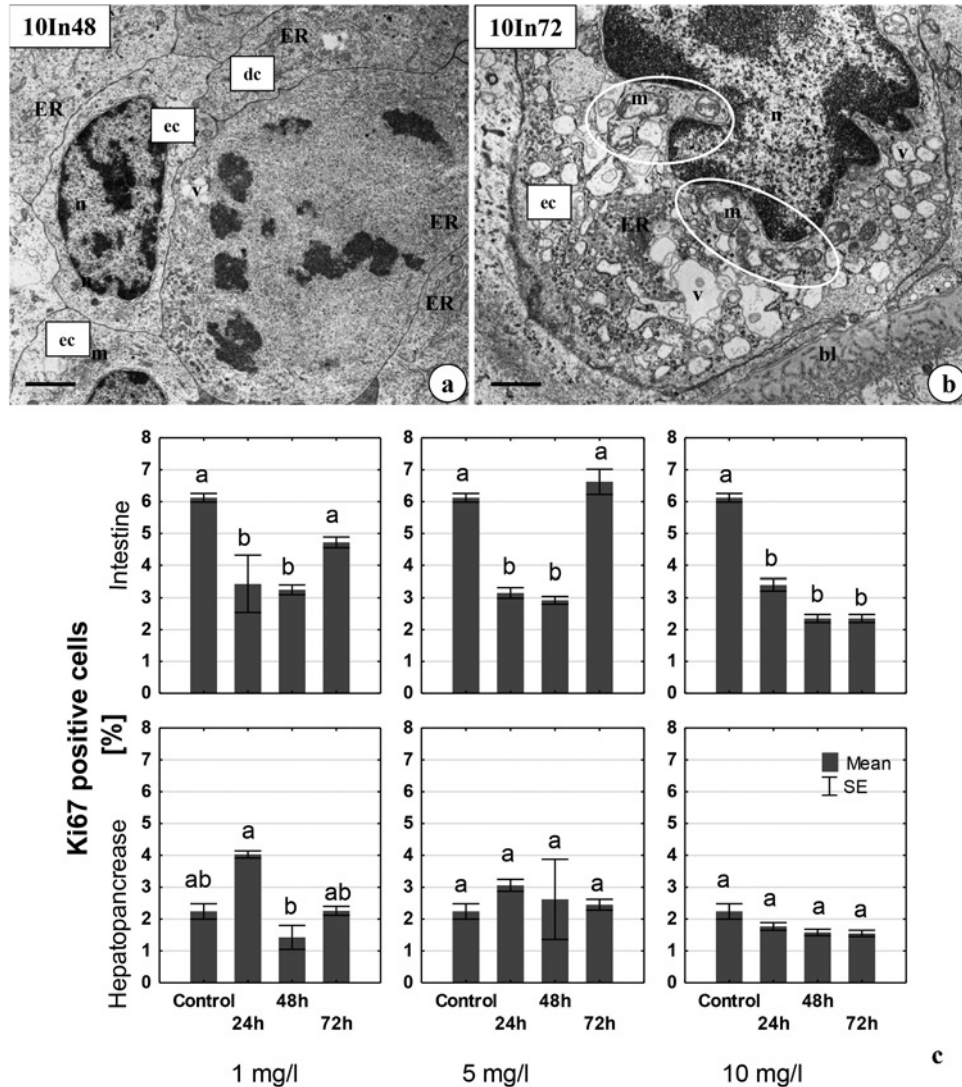


Figure 9. (a-b) Ultrastructure of E-cells in 10In48 (a) and 10In72 (b) experimental groups (BPA exposure). D-cells (dc), E-cells (ec), cisterns of ER (ER), nuclei (n), vacuoles (v), basal lamina (bl), mitochondria (m), degenerated mitochondria (white circles). TEM. (a) Scale bar = 1.8 μ m. (b) Scale bar = 0.7 μ m. (c) Percentage of Ki67-positive cells (mean $\pm$ SE) in the intestine (CIn) and hepatopancreas (CH) of *N. davidi* individuals subjected to BPA exposure in concentrations: 1 mg·l⁻¹, 5 mg·l⁻¹ and 10 mg·l⁻¹ for 24, 48 and 72 h. Different letters (a, b) indicate statistically significant differences between experimental groups within each concentration and organ using the Tukey test, $p < 0.05$; $n = 5$.

Table III. Analysis of variance (ANOVA/MANOVA) for measured parameters in the intestine and in the hepatopancreas of *N. davidi* (with organ – O; concentrations of BPA – C; periods of BPA exposure – P, as categorical factors).

Source of variation	df	G0/G1		S		G2/M		Ki67	
		F	p	F	p	F	P	F	P
O	1	0.50	0.481	43.50	<0.001	3.72	0.057	165.94	<0.001
C	2	27.55	<0.001	4.42	0.014	60.46	<0.001	15.71	<0.001
P	3	35.85	<0.001	2.01	0.118	76.52	<0.001	25.26	<0.001
O/C	2	0.53	0.593	8.15	0.001	0.62	0.541	0.44	0.645
O/P	3	11.40	<0.001	5.321	0.002	13.61	<0.001	27.76	<0.001
C/P	6	5.90	<0.001	2.21	0.048	10.06	<0.001	5.57	<0.001
O/C/PT	6	2.65	0.020	2.43	0.031	5.57	<0.001	5.77	<0.001

reduction in the percentage of cells in the G0/G1 phase in this organ compared to the control only after 72 hours of exposure ($F(1, 8) = 41.6$, $p = 0.0001$), while bisphenol at a concentration of $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ caused a significant reduction in the percentage of cells in the G0/G1 phase compared to the control after 24 hours ($F(1, 8) = 870.5$, $p = 0.00001$) and 72 hours ($F(1, 8) = 48.6$, $p = 0.0001$). In the group of individuals exposed to bisphenol at a concentration of $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, the percentage of cells in the G0/G1 phase in the hepatopancreas was similar to the control, regardless of the time of exposure to this compound. Exposure of shrimp to higher concentrations of bisphenol, $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ and $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, resulted in a significant decrease in the percentage of cells in the G0/G1 phase only after 48 hours of exposure: $F(1, 8) = 86.1$, $p = 0.0001$ and $F(1, 8) = 93.9$, $p = 0.0001$, respectively) (Figure 10).

3.5.2.2. S phase. No significant changes were observed in the percentage of cells in the S phase in the shrimp intestine compared to the control after bisphenol exposure. A significant reduction in the percentage of cells in this phase in the hepatopancreas was recorded only after exposure to bisphenol at a concentration of $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ for 48 hours ($F(1, 8) = 159.1$, $p = 0.0002$) compared to the control (Figure 10).

3.5.2.3. G2/M phase. In both the intestine and the hepatopancreas, bisphenol at concentrations of $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ and $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ caused a significant increase in the percentage of cells in the G2/M phase compared to the control (on average, more than 20-fold in the intestine and fourfold in the hepatopancreas) at all exposure times. The lowest concentration of bisphenol did not cause changes in the percentage of cells in the G2/M phase in the hepatopancreas, whereas, in the intestine, bisphenol at a concentration of $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ caused a significant increase in the percentage of cells in

the G2/M phase compared to the control after 72 hours of exposure ($F(1, 8) = 65.4$, $p = 0.0002$) (Figure 10).

4. Discussion

Several studies revealed the cytotoxicity of BPA for vertebrate cells and tissues (Canesi & Fabbri 2015). However, data on the cytotoxicity of BPA or its derivatives on invertebrates, including those living in freshwater environments, which constitute an important link in trophic chains and are a source of food for other animals, are sporadic (Canesi & Fabbri 2015; Li et al. 2021). Therefore, it is currently difficult to discuss the obtained results related to changes in cells at the ultrastructural level or the activation of cell death and cell proliferation processes. Cytotoxic activity is measured, among other methods, by the assessment of cell proliferation, i.e., activation or inhibition of cell division and the occurrence of changes in successive phases of the cell cycle (Morgan et al. 2006). When cells in tissues and organs are damaged or cell death is activated, cell division is intensified for repair purposes. In this way, homeostasis is maintained in the organs (Amcheslavsky et al. 2009; Istifli et al. 2019; Lee et al. 2021). Activation of cell proliferation under the influence of BPA or its derivatives has been demonstrated in the case of cancer cells whose development is hormone-dependent (Zhang et al. 2024), while in non-cancerous cells, it inhibits DNA replication and proliferation and activates cell death processes (Liu et al. 2013; Kidani et al. 2017; Aysin 2024). In the freshwater fish *Carassius auratus*, increased lymphocyte proliferation has been described at concentrations ranging from $5 \mu\text{g/l}$ to 50 mg/l , while at higher doses ($500\text{--}1000 \text{ mg/l}$), BPA inhibits macrophage proliferation (Yin et al. 2007). In *D. melanogaster*, BPA, by causing the death of midgut cells, also induces the proliferation of intestinal stem cells in this organ (Chen et al. 2022). Thereby, this organ's homeostasis is maintained (Lee et al. 2021).

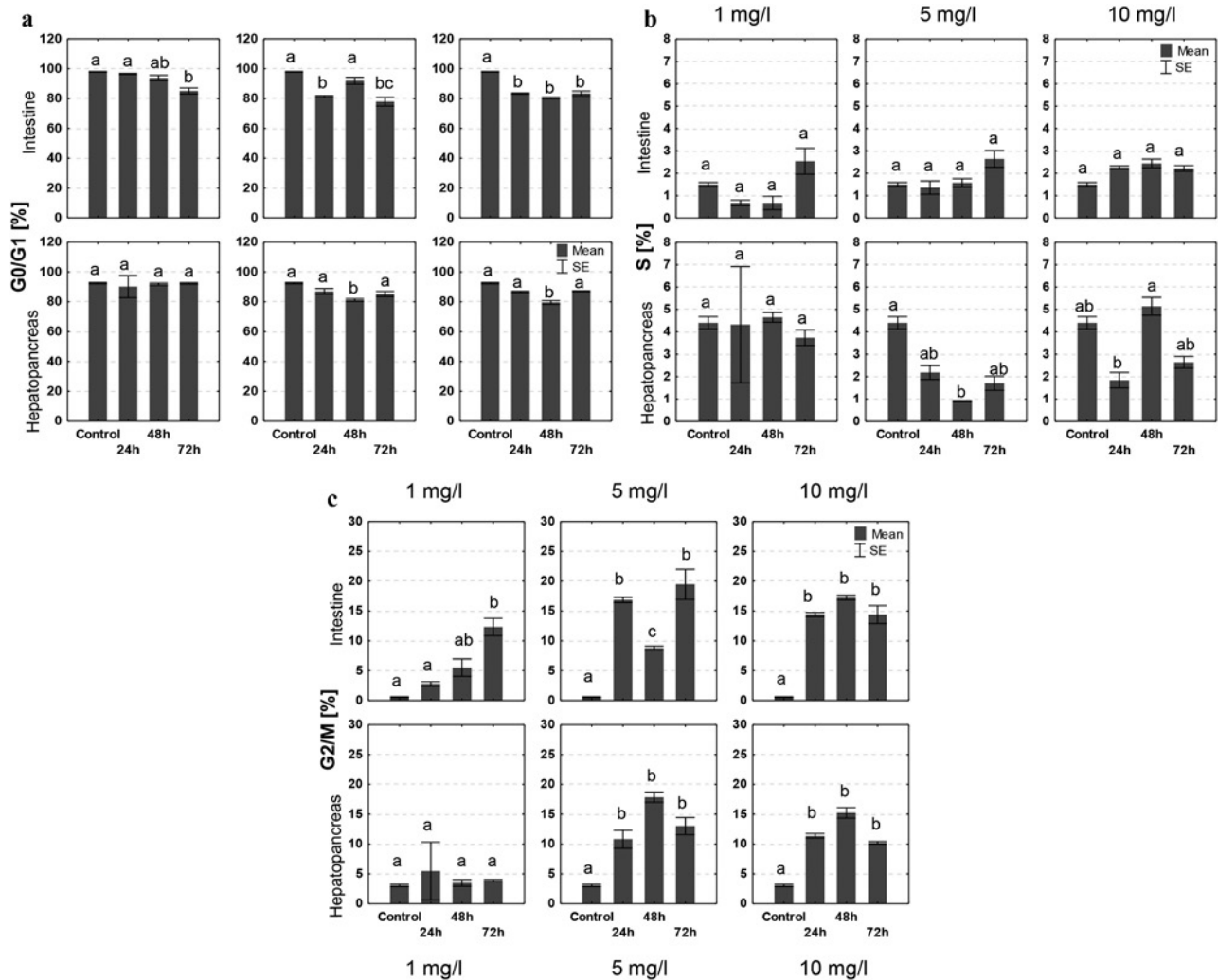


Figure 10. (a) Percentage of cells in G0/G1 phase (mean $\pm$ SE) in the intestine (CI) and hepatopancreas (CH) of *N. davidi* individuals subjected to BPA exposure in concentrations: 1 mg·l⁻¹, 5 mg·l⁻¹, and 10 mg·l⁻¹ for 24, 48, and 72 h. Different letters (a, b, c) indicate statistically significant differences between experimental groups within each concentration and organ using the Tukey test, $p < 0.05$; $n = 5$. (b) Percentage of cells in S phase (mean $\pm$ SE) in the intestine (CI) and hepatopancreas (CH) of *N. davidi* individuals subjected to BPA exposure in the concentrations: 1 mg·l⁻¹, 5 mg·l⁻¹ and 10 mg·l⁻¹ for 24, 48 and 72 h. Different letters (a, b) indicate statistically significant differences between experimental groups within each concentration and organ using the Tukey test, $p < 0.05$; $n = 5$. (c) Percentage of cells in G2/M phase (mean $\pm$ SE) in the intestine (CI) and hepatopancreas (CH) of *N. davidi* individuals subjected to BPA exposure in the concentrations: 1 mg·l⁻¹, 5 mg·l⁻¹, and 10 mg·l⁻¹ for 24, 48 and 72 h. Different letters (a, b, c) indicate statistically significant differences between experimental groups within each concentration and organ using the Tukey test, $p < 0.05$; $n = 5$.

Thus, in many cases, BPA may have an anti-proliferative or pro-proliferative effect, depending on what other additional mechanisms are activated. Electron microscopy revealed the presence of mitotic divisions after exposure of *N. davidi* to different BPA concentrations. In both organs, E-cells located in the anterior part of the intestinal epithelium between D-cells and in the distal regions of the hepatopancreatic tubules are capable of proliferation. They act as stem cells of the midgut epithelium of the tested shrimp (Sonakowska et al. 2015; Sonakowska-Czajka

et al. 2021). However, at a concentration of 10 mg/L and an experiment duration of 48 and 72 h, necrotic changes appear in the cytoplasm of *N. davidi* intestinal E-cells, indicating degenerative changes. BPA concentrations lower than 10 mg/L did not activate the degeneration of cell organelles in these cells. Quantitative analysis of Ki67-positive cells showed that in both the intestine and hepatopancreas, their number decreases with increasing BPA concentration in the environment and the animals' lifetime in contaminated water. This would indicate inhibition of the

proliferation of epithelial stem cells in both organs under the influence of the tested xenobiotic. However, in the hepatopancreas, this decrease is not statistically significant. There are also no changes in hepatopancreatic E-cells at the ultrastructural level, meaning these cells were not directly exposed to the xenobiotic. Ki67 protein is activated in the cell during the active phases of the cell cycle, i.e., G1, S, G2, and M, but undetected in the G0 phase. Therefore, it is considered a good indicator of cell proliferation (Bullwinkel et al. 2006). BPA present in the living environment of freshwater shrimp caused a slight reduction in the level of cell proliferation in the intestinal epithelium, while in the hepatopancreas, BPA at selected concentrations did not affect the mitotic division of E-cells. However, DNA damage causes the arrest of the cell in the G1 phase of the cell cycle. Thus, it does not enter the S phase, and eventually mitosis is blocked (Trzcińska 2003). This is also confirmed by studies analyzing cells in individual phases of the cell cycle in the hepatopancreas. The exception, however, is a distinct increase in the number of cells in the G2/M phase (48 h for concentrations of 5 and 10 mg/l) and the number of cells in the S phase (48 h for a concentration of 10 mg/l) in the hepatopancreas, so a pro-active effect is suggested at these concentrations. In the intestine, where E-cells show vacuolation, the number of Ki67-positive cells and cells in the S and G2/M phases is reduced. This will probably be related to greater exposure of the intestinal epithelium to the action of xenobiotics and increased protection of hepatopancreatic tubular cells of the crustacean, which has already been suggested in previous studies on this species (Ostróżka et al. 2022, 2024). These results indicate that depending on the concentration of BPA in the living environment of freshwater crustaceans, epithelial stem cells in the digestive system will show increased proliferative potential or their functioning will be inhibited by activated degenerative processes in them.

BPA is known to cause degenerative changes in organelles in various cells and tissues (Pan et al. 2021). It causes severe vacuolization of the cytoplasm, distention of the cisternae of the endoplasmic reticulum and mitochondria, and damage to the cell nucleus (Hasanluyi et al. 2016; Vijaykumar et al. 2017). Analyzing changes in the structure of cell organelles in the intestine of *N. davidi*, gradual degeneration of D-cells was observed with increasing exposure time of crustaceans to BPA and its increasing concentration. Meanwhile, these changes appeared gradually in the hepatopancreas and were clearly visible only at the highest BPA concentration,

i.e. 10 mg/l. This again confirms that the hepatopancreas is a more protected organ than the intestine. Similar changes in cell organelle degeneration have been reported in the midgut of *D. melanogaster* under the influence of BPA and oxidative stress-activated by this xenobiotic (Chen et al. 2022). Significant changes at the ultrastructural level, caused by the presence of BPA and its derivatives in the aquatic environment, have been well described in e.g., algae in which distinct degradation of cytoplasm and organelles were detected (Yu et al. 2007; Li et al. 2009; Fabrello et al. 2024). It is suggested that the bioaccumulation of BPA in these organisms may affect subsequent links in the food chain (Fabrello et al. 2024), including the currently investigated shrimp. In *N. davidi*, changes in the ultrastructure of cell organelles caused by various stressors are manifested before other mechanisms are impaired (Włodarczyk et al. 2017; Włodarczyk, Student et al. 2019; Włodarczyk, Wilczek et al. 2019; Ostróżka et al. 2022, 2024). Additionally, it was observed that autophagy occurs more intensively in the epithelial cells of both the intestine and the hepatopancreas with increasing degeneration of cell organelles. This process is activated, among other factors, when damaged organelles and cell structures appear in the cells. Their destruction protects the cell from triggering cell death (Klionsky 2016, 2021). During this process, reserve materials accumulated in cells may be digested, e.g., lipids, polysaccharides, or proteins, which will constitute an energy reservoir (Zhang et al. 2022). The activation of degenerative processes requires energy input to activate, for example, antioxidant processes and facilitate tissue regeneration (Pook et al. 2009; Bednarska et al. 2013; Bednarska & Stachowicz 2013; Lipovšek et al. 2018). It was revealed during analyses connected with effects of different stressors on aquatic vertebrates and invertebrates e.g., *Danio rerio*, (Smolders et al. 2003), *Neomysis integer* (Verslycke et al. 2004), *N. davidi* (Włodarczyk, Student et al. 2019, Ostróżka et al. 2022) as well as terrestrial animals, e.g., insects (Bednarska et al. 2013; Tettamanti & Casartelli 2019), crustaceans (Donker 1992), arachnids (Lipovšek et al. 2018). BPA is one of the stressors that activate autophagy, including lipophagy (Lee et al. 2021; Park et al. 2023). In the intestine of *N. davidi*, where cell organelles are damaged, autophagy will be responsible for their neutralization to protect the cell against apoptosis or even necrosis with inflammation for as long as possible (Ostróżka et al. 2022, 2024). However, in hepatopancreatic cells, autophagy will be mainly responsible for the digestion of reserve materials

accumulated in tubular B cells (especially lipids and small amounts of polysaccharides), which suggests a decreasing amount of these reserve materials with increasing exposure time of animals to BPA, as well as with their increasing concentrations. Lipids are essential for providing the energy needed for numerous cellular processes, and they are constantly recycled within the cytoplasm and organelles (Jaishy & Abel 2016). Lipids can be utilized during lipophagy, which is a type of selective autophagy, or during lipolysis (Zechner et al. 2017; Elander et al. 2018; Xie et al. 2020; Rost-Roszkowska et al. 2022). Similar results were obtained for *N. davidi* individuals exposed to pesticide or nickel (Ostróžka et al. 2022, 2024). However, the fact that lipids appear in D-cells of the intestinal epithelium in the 5In24, 5In48, and 10In24 groups seems interesting, especially since the cytoplasm of these cells does not accumulate reserve materials (Sonakowska et al. 2015; Sonakowska-Czajka et al. 2021). Similarly, when individuals of this species are exposed to a pesticide (dimethoate), reserve materials begin to accumulate in the cytoplasm of D-cells (Ostróžka et al. 2022). The accumulation of lipid droplets seems to be correlated with the effect of BPA on animal cells (Wang et al. 2012; Vijaykumar et al. 2017), because BPA disturbs lipid metabolism in animal cells and tissues (Haq et al. 2020; Yang et al. 2022). This confirms previous suggestions that in both organs the processes of detoxification and cell protection occur slightly differently, being related to the energy budget and its balancing. Degenerative changes occurring in cells as a result of exposure to toxic substances regenerate faster in the event of increased energy expenditure (Bednarska et al. 2013; Bednarska & Stachowicz 2013).

5. Conclusions

This study provided information about BPA-induced degenerative changes in the endodermal region of the digestive system in the freshwater shrimp *N. davidi*. The results suggest that (1) not all organs and tissues react similarly to the highly toxic BPA; (2) the concentration and exposure time of freshwater animals affect the functioning of stem cells – it may have anti- or pro-proliferative effects; (3) autophagy and lipid digestion play an important role in protecting cells against the effects of BPA, which is also related to the increased energy demand of cells. However, further studies are needed to determine whether the effects of BPA are reversible,

which cell death processes are involved in tissue damage, including the participation of different pathways, and which antioxidative mechanisms may play a role in cell survival.

Acknowledgments

We thank Dr. Danuta Urbańska-Jasik (University of Silesia in Katowice, Poland) for her technical assistance and Richard Ashcroft (<http://www.anglopolonia.com/home.html>) for language correction.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

ORCID

S. Student  <http://orcid.org/0000-0003-1812-5496>

M. Rost-Roszkowska  <http://orcid.org/0000-0001-7124-8423>

References

- Amcheslavsky A, Jiang J, Ip YT. 2009. Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* 4 (1):49–61. DOI: [10.1016/j.stem.2008.10.016](https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.016).
- Aysin F. 2024. Bisphenol a promotes cell death in healthy respiratory system cells through inhibition of cell proliferation and induction of G2/M cell cycle arrest. *Environmental Toxicology* 39(5):3264–3273. DOI: [10.1002/tox.24203](https://doi.org/10.1002/tox.24203).
- Bednarska AJ, Stachowicz I. 2013. Costs of living in metal polluted areas: Respiration rate of the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus* from two gradients of metal pollution. *Ecotoxicology* 22(1):118–124. DOI: [10.1007/s10646-012-1008-y](https://doi.org/10.1007/s10646-012-1008-y).
- Bednarska AJ, Stachowicz I, Kuriańska L. 2013. Energy reserves and accumulation of metals in the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus* from two metal-polluted gradients. *Environmental Science and Pollution Research* 20 (1):390–398. DOI: [10.1007/s11356-012-0993-y](https://doi.org/10.1007/s11356-012-0993-y).
- Bednarska AJ, Świątek Z. 2016. Subcellular partitioning of cadmium and zinc in mealworm beetle (*Tenebrio molitor*) larvae exposed to metal-contaminated flour. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 133:82–89. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2016.06.033](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.033).
- Björnsdotter MK, de Boer J, Ballesteros-Gómez A. 2017. Bisphenol a and replacements in thermal paper: A review. *Chemosphere* 182:691–706. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2017.05.070](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.070).
- Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. 2006. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *Journal of Cellular Physiology* 206(3):624–635. DOI: [10.1002/jcp.20494](https://doi.org/10.1002/jcp.20494).
- Canesi L, Betti M, Lorusso LC, Ciacci C, Gallo G. 2005. 'In vivo' effects of Bisphenol A in *Mytilus* hemocytes: Modulation of kinase-mediated signalling pathways. *Aquatic*

- Toxicology 71(1):73–84. DOI: [10.1016/j.aquatox.2004.10.011](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.10.011).
- Canesi L, Fabbri E. 2015. Environmental effects of BPA: Focus on aquatic species. Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society 13(3):1559325815598304. DOI: [10.1177/1559325815598304](https://doi.org/10.1177/1559325815598304).
- Careghini A, Mastorgio AF, Saponaro S, Sezenna E. 2015. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: A review. Environmental Science and Pollution Research 22(8):5711–5741. DOI: [10.1007/s11356-014-3974-5](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3974-5).
- Castritsi-Catharios J, Syriou V, Miliou H, Zouganelis GD. 2013. Toxicity effects of bisphenol a to the nauplii of the brine shrimp *Artemia franciscana*. Journal of Biological Research-Thessaloniki 19:38–45.
- Chen S, Li X, Li H, Yuan S, Li J, Liu C. 2021. Greater toxic potency of bisphenol AF than bisphenol a in growth, reproduction, and transcription of genes in *Daphnia magna*. Environmental Science and Pollution Research 28(20):25218–25227. DOI: [10.1007/s11356-020-12153-5](https://doi.org/10.1007/s11356-020-12153-5).
- Chen Z, Wang F, Wen D, Mu R. 2022. Exposure to bisphenol a induced oxidative stress, cell death and impaired epithelial homeostasis in the adult *Drosophila melanogaster* midgut. Ecotoxicology & Environmental Safety 248:114285. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2022.114285](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114285).
- Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed C, Williams ES, Brooks BW. 2015. Global assessment of bisphenol a in the environment: Review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society 13(3):1559325815598308. DOI: [10.1177/1559325815598308](https://doi.org/10.1177/1559325815598308).
- Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, Guillette Jr. LJ. 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. Reproductive Toxicology 24(2):225–239. DOI: [10.1016/j.reprotox.2007.05.008](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.008).
- Donker MH. 1992. Energy reserves and distribution of metals in populations of the isopod *Porcellio scaber* from metal-polluted sites. Functional Ecology 6(4):445–454. DOI: [10.2307/2389282](https://doi.org/10.2307/2389282).
- Elander PH, Minina EA, Bozhkov PV, Raines C. 2018. Autophagy in turnover of lipid stores: Trans-kingdom comparison. Journal of Experimental Botany 69(6):1301–1311. DOI: [10.1093/jxb/erx433](https://doi.org/10.1093/jxb/erx433).
- Esperanza M, Seoane M, Servia MJ, Cid A. 2020. Effects of bisphenol A on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and the clam *Corbicula fluminea*. Ecotoxicology & Environmental Safety 197:110609. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2020.110609](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110609).
- Fabbri R, Montagna M, Balbi T, Raffo E, Palumbo F, Canesi L. 2014. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research 99:1–8. DOI: [10.1016/j.marenvres.2014.05.007](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.05.007).
- Fabrello J, Guidorizzi S, Piscato M, Battistuzzi M, Moschin E, Vecchia FD, Moro I, Roverso M, Bogialli S, Matozzo V. 2024. Ultrastructural changes, pigment responses and bioaccumulation in the microalga *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin exposed to BPA analogues. Aquatic Toxicology 272:106970. DOI: [10.1016/j.aquatox.2024.106970](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106970).
- Fabrello J, Matozzo V. 2022. Bisphenol analogs in aquatic environments and their effects on marine species – a review. Journal of Marine Science and Engineering 10(9):1271. DOI: [10.3390/jmse10091271](https://doi.org/10.3390/jmse10091271).
- Franzetti E, Huang ZJ, Shi YX, Xie K, Deng XJ, Li JP, Li Q, Yang W-Y, Zeng W-N, Casartelli M, Deng H-M, Cappellozza S, Grimaldi A, Xia Q, Tettamanti G, Cao Y, Feng Q. 2012. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. Apoptosis 17(3):305–324. DOI: [10.1007/s10495-011-0675-0](https://doi.org/10.1007/s10495-011-0675-0).
- Gerhardt A. 2019. Plastic additive bisphenol A: Toxicity in surface- and groundwater crustaceans. Journal of Toxicology and Risk Assessment 5(1):017. DOI: [10.23937/2572-4061.1510017](https://doi.org/10.23937/2572-4061.1510017).
- Gonkowski S, Makowska K. 2022. Environmental pollution with bisphenol A and phthalates – a serious risk to human and animal health. International Journal of Environmental Research and Public Health 19(21):13983. DOI: [10.3390/ijerph192113983](https://doi.org/10.3390/ijerph192113983).
- Haq ME, Akash MSH, Rehman K, Mahmood MH. 2020. Chronic exposure of bisphenol a impairs carbohydrate and lipid metabolism by altering corresponding enzymatic and metabolic pathways. Environmental Toxicology and Pharmacology 78:103387. DOI: [10.1016/j.etap.2020.103387](https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103387).
- Hasanluyi EA, Khojasteh SMB, Nejhad DM. 2016. Investigation of the effects of bisphenol a on the histology and ultrastructure of prostate and seminal vesicle glands in rats. Thrita Journal of Neuron 5(4):e38611. DOI: [10.5812/thrita.38611](https://doi.org/10.5812/thrita.38611).
- Istifi ES, Hüsnet MT, İla HB. 2019. Cell division, cytotoxicity, and the assays used in the detection of cytotoxicity. In: Istifi E, İla H, editors. Cytotoxicity – definition, identification, and cytotoxic compounds. IntechOpen. DOI: [10.5772/intechopen.88368](https://doi.org/10.5772/intechopen.88368).
- Jabłońska A, Mamos T, Gruszka P, Szlauer-Lukaszewska A, Grabowski M. 2018. First record and DNA barcodes of the aquarium shrimp, *Neocaridina davidi*, in Central Europe from thermally polluted River Oder canal, Poland. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 419(14):1–5. DOI: [10.1051/kmae/2018004](https://doi.org/10.1051/kmae/2018004).
- Jaishy B, Abel ED. 2016. Lipids, lysosomes, and autophagy. Journal of Lipid Research 57(9):1619–1635. DOI: [10.1194/jlr.R067520](https://doi.org/10.1194/jlr.R067520).
- Jurek A, Leitner E. 2018. Analytical determination of bisphenol a (BPA) and bisphenol analogues in paper products by LC-MS/MS. Food additives & contaminants. Part A: Chemistry, analysis, control. Exposure and Risk Assessment 35(11):2256–2269. DOI: [10.1080/19440049.2018.1524157](https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1524157).
- Kidani T, Yasuda R, Miyawaki J, Oshima Y, Miura H, Masuno H. 2017. Bisphenol a inhibits cell proliferation and reduces the motile potential of murine LM8 osteosarcoma cells. Anticancer Research April 37(4):1711–1722. DOI: [10.21873/anticancer.11503](https://doi.org/10.21873/anticancer.11503).
- Klionsky D. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy 12(1):1–222. DOI: [10.1080/15548627.2015.1100356](https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356).
- Klionsky D. 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) 1. Autophagy 17(1):1–382. DOI: [10.1080/15548627.2020.1797280](https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280).
- Lee C-C, Jiang LY, Kuo YL, Chen C, Hsieh C, Hung C, Tien CJ. 2015. Characteristics of nonylphenol and bisphenol a accumulation by fish and implications for ecological and human Health. Science of the Total Environment 502:417–425. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2014.09.042](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.042).
- Lee J, Park H, Yoon J. 2003. Ozonation characteristics of bisphenol a in water. Environmental Technology 24(2):241–248. DOI: [10.1080/09593330309385555](https://doi.org/10.1080/09593330309385555).
- Lee SH, Goo TW, Yun EY. 2021. Allomyrina dichotoma larval extract has protective effects against gut permeability of dextran sulfate sodium-fed *Drosophila* by E-cadherin and armadillo. Journal of Ethnopharmacology 279:113786. DOI: [10.1016/j.jep.2021.113786](https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113786).

- Li D, Chen H, Bi R, Xie H, Zhou Y, Luo Y, Xie L. 2018. Individual and binary mixture effects of bisphenol a and a lignin-derived bisphenol in *Daphnia magna* under chronic exposure. *Chemosphere* 191:779–786. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2017.10.022](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.022).
- Li H, Zhang Z, Sun Y, Wang W, Xie J, Xie C, Hu Y, Gao Y, Xu X, Mai B. 2021. Tetrabromobisphenol a and hexabromocyclododecanes in sediments and biota from two typical mangrove wetlands of South China: Distribution, bioaccumulation and biomagnification. *Science of the Total Environment* 750:141695. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.141695](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141695).
- Li R, Chen GZ, Tam NFY, Luan TG, Shin PK, Cheung SG, Liu Y. 2009. Toxicity of bisphenol a and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 72(2):321–328. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2008.05.012](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.012).
- Lipovšek S, Leitinger G, Novak T, Janžekovič F, Gorgoň S, Kamińska K, Rost-Roszkowska MM. 2018. Changes in the midgut cells in the European cave spider, *Meta menardi*, during starvation in spring and autumn. *Histochemistry and Cell Biology* 149(3):245–260. DOI: [10.1007/s00418-017-1623-z](https://doi.org/10.1007/s00418-017-1623-z).
- Liu R, Xing L, Kong D, Jiang J, Shang L, Hao W. 2013. Bisphenol a inhibits proliferation and induces apoptosis in micromass cultures of rat embryonic midbrain cells through the JNK, CREB and p53 signaling pathways. *Food & Chemical Toxicology* 52:76–82. DOI: [10.1016/j.fct.2012.10.033](https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.033).
- Malagoli D, Abdalla FC, Cao Y, Feng Q, Fujisaki K, Gregorc A, Matsuo T, Nezis IP, Papassideri IS, Sass M, Silva-Zacarin EC, Tettamanti G, Umemiya-Shirafuji R. 2010. Autophagy and its physiological relevance in arthropods: current knowledge and perspectives. *Autophagy* 6(5):575–588. DOI: [10.4161/auto.6.5.11962](https://doi.org/10.4161/auto.6.5.11962).
- Morgan MA, Parsels MA, Parsels JD, Lawrence TS, Maybaum J. 2006. The relationship of premature mitosis to cytotoxicity in response to checkpoint abrogation and antimetabolite treatment. *Cell Cycle* 5(17):1983–1988. DOI: [10.4161/cc.5.17.3184](https://doi.org/10.4161/cc.5.17.3184).
- Nayak D, Adiga D, Khan NG, Rai PS, Dsouza HS, Chakrabarty S, Gassman NR, Kabekkodu SP. 2022. Impact of bisphenol a on structure and function of mitochondria: A critical review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 260(10):1–23. DOI: [10.1007/s44169-022-00011-z](https://doi.org/10.1007/s44169-022-00011-z).
- Neri I, Russo G, Grumetto L. 2024. Bisphenol a and its analogues: From their occurrence in foodstuffs marketed in Europe to improved monitoring strategies – a review of published literature from 2018 to 2023. *Archives of Toxicology* 98(8):2441–2461. DOI: [10.1007/s00204-024-03793-4](https://doi.org/10.1007/s00204-024-03793-4).
- Ostróżka A, Chajec Ł, Wilczek G, Student S, Kocot K, Homa J, Rost-Roszkowska MM. 2024. Toxic effects of nickel on tolerance and regeneration in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *European Zoological Journal* 91(1):180–205. DOI: [10.1080/24750263.2024.2310041](https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2310041).
- Ostróżka A, Tiffert Z, Wilczek G, Rost-Roszkowska M. 2022. Can insecticide-free clean water regenerate the midgut epithelium of the freshwater shrimp after dimethoate treatment? *Micron* 155:103162. DOI: [10.1016/j.micron.2021.103162](https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103162).
- Pan M-H, Wu Y-K, Liao B-Y, Zhang H, Li C, Wang J-L, Hu L-L, Ma B. 2021. Bisphenol a exposure disrupts organelle distribution and functions during mouse oocyte maturation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9:661155. DOI: [10.3389/fcell.2021.661155](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661155).
- Pantaleão JAF, Barros-Alves SDP, Tropea C, Alves DF, Negreiros-Fransozo ML, López-Greco LS. 2015. Nutritional vulnerability in early stages of the freshwater ornamental “Red Cherry shrimp” *Neocaridina davidi* (Caridea: Atyidae). *Journal of Crustacean Biology* 35(5):676–681. DOI: [10.1163/1937240X-00002357](https://doi.org/10.1163/1937240X-00002357).
- Park S-J, Jang J-W, Moon E-Y. 2023. Bisphenol a – induced autophagy ameliorates human B cell death through Nrf2-mediated regulation of Atg7 and Beclin1 expression by Syk activation. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 260:115061. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2023.115061](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115061).
- Pook C, Lewis C, Galloway T. 2009. The metabolic and fitness costs associated with metal resistance in *Nereis diversicolor*. *Marine Pollution Bulletin* 58(7):1063–1071. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2009.02.003](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.02.003).
- Poprawa I, Chajec Ł, Chachulski-Żymelka A, Wilczek G, Student S, Leśniewska M, Rost-Roszkowska MM. 2022. Ovaries and testes of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda) react differently to the presence of cadmium in the environment. *Scientific Reports* 12(1):6705. DOI: [10.1038/s41598-022-10664-4](https://doi.org/10.1038/s41598-022-10664-4).
- Rost-Roszkowska M, Janelt K, Poprawa I. 2018. The role of autophagy in the midgut epithelium of Parachela (Tardigrada). *Zoomorphology* 37(4):501–509. DOI: [10.1007/s00435-018-0407-x](https://doi.org/10.1007/s00435-018-0407-x).
- Rost-Roszkowska M, Machida R, Fukui M. 2010. The role of cell death in the midgut epithelium in *Filientomon takanawanum* (Protura). *Tissue & Cell* 42(1):24–31. DOI: [10.1016/j.tice.2009.06.003](https://doi.org/10.1016/j.tice.2009.06.003).
- Rost-Roszkowska M, Vilimová J, Tajovský K, Chachulski-Żymelka A, Sosinka A, Kszuk-Jendryś M, Ostróżka A, Kaszuba F. 2019. Autophagy and apoptosis in the midgut epithelium of Millipedes. *Microscopy and Microanalysis* 25(4):1004–1016. DOI: [10.1017/S143192761900059X](https://doi.org/10.1017/S143192761900059X).
- Rost-Roszkowska MM, Mermer P, Chajec Ł, Sosinka A, Wilczek G, Student S, Wrońska A, Karnówka O. 2024. Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *European Zoological Journal* 91(1):213–234. DOI: [10.1080/24750263.2024.2308529](https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529).
- Rost-Roszkowska MM, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulski-Żymelka A, Wilczek G, Skowronek M, Student S, Leśniewska M. 2022. Hazards related to the presence of cadmium in food – studies on the European soil centipede, *Lithobius forficatus*. *Science of the Total Environment* 845:157298. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.157298](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157298).
- Rost-Roszkowska MM, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulski-Żymelka A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Skowronek M, Nadgórska-Socha A, Leśniewska M. 2020. Influence of soil contaminated with cadmium on cell death in the digestive epithelium of soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). *European Zoological Journal* 87(1):242–262. DOI: [10.1080/24750263.2020.1757168](https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1757168).
- Rost-Roszkowska MM, Vilimová J, Tajovský K, Šustr V, Ostróżka A, Kaszuba F. 2021. Structure of the midgut epithelium in four diplopod species: Histology, histochemistry and ultrastructure. *Arthropod Systematics & Phylogeny* 79:295–308. DOI: [10.3897/asp.79.e67022](https://doi.org/10.3897/asp.79.e67022).
- Siracusa JS, Yin L, Measel E, Liang S, Yu X. 2018. Effects of bisphenol a and its analogs on reproductive health: A mini review. *Reproductive Toxicology* 79:96–123. DOI: [10.1016/j.reprotox.2018.06.005](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.005).
- Smolders R, De Boeck G, Blust R. 2003. Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 22(4):890–899. DOI: [10.1002/etc.5620220429](https://doi.org/10.1002/etc.5620220429).
- Sonakowska L, Włodarczyk A, Poprawa I, Binkowski M, Śróbka J, Kamińska K, Kszuk-Jendryś M, Chajec Ł,

- Zajusz B. 2015. Structure and ultrastructure of the endodermal region of the alimentary tract in the freshwater shrimp *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca). PLoS One 10(5):e0126900. DOI: [10.1371/journal.pone.0126900](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126900).
- Sonakowska L, Włodarczyk A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Rost-Roszkowska MM, Lebedeva IV. 2016. Cell death in the epithelia of the intestine and hepatopancreas in *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca). PLOS ONE 11(2): e0147582. DOI: [10.1371/journal.pone.0147582](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147582).
- Sonakowska-Czajka L, Śróbka J, Ostróžka A, Rost-Roszkowska MM. 2021. Postembryonic development and differentiation of the midgut in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca, Decapoda) larvae. Journal of Morphology 282(1):48–65. DOI: [10.1002/jmor.21281](https://doi.org/10.1002/jmor.21281).
- Tettamanti G, Casartelli M. 2019. Cell death during complete metamorphosis. Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences 374(1783):20190065. DOI: [10.1098/rstb.2019.0065](https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0065).
- Tropea C, Stumpf L, López Greco LS, Thuesen EV. 2015. Effect of temperature on biochemical composition, growth and reproduction of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina heteropoda* (Decapoda, Caridea). PLOS ONE 10(3):e0119468. DOI: [10.1371/journal.pone.0119468](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119468).
- Trzcińska M. 2003. Apoptosis – molecular mechanism of the process and selected detection methods in biology of reproduction. Biotechnologia 60(1):93–105.
- Umar M, Roddick F, Fan L, Aziz HA. 2013. Application of ozone for the removal of bisphenol a from water and wastewater – a review. Chemosphere 90(8):2197–2207. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2012.09.090](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.090).
- Verslycke T, Roast SD, Widdows J, Jones MB, Janssen CR. 2004. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: A method comparison. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 306(1):1–16. DOI: [10.1016/j.jembe.2003.12.022](https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.022).
- Vijaykumar T, Singh D, Vanage GR, Dhupal RV, Dighe VD. 2017. Bisphenol a –induced ultrastructural changes in the testes of common marmoset. The Indian Journal of Medical Research 146(1):126–137. DOI: [10.4103/ijmr.IJMR_927_15](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_927_15).
- Wang FF, Wang Q, Chen Y, Lin Q, Gao HB, Zhang P. 2012. Chronic stress induces ageing-associated degeneration in rat Leydig cells. Asian Journal of Andrology 14(4):643–648. DOI: [10.1038/aja.2011.183](https://doi.org/10.1038/aja.2011.183).
- Weber S, Traunspurger W. 2016. Influence of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) on freshwater meiofaunal assemblages. Limnologia 59:155–161. DOI: [10.1016/j.limno.2016.06.001](https://doi.org/10.1016/j.limno.2016.06.001).
- Włodarczyk A, Sonakowska L, Kamińska K, Marchewka A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Rost-Roszkowska M. 2017. The effect of starvation and re-feeding on mitochondrial potential in the midgut of *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). PLOS ONE 12(3):e0173563. DOI: [10.1371/journal.pone.0173563](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173563).
- Włodarczyk A, Student S, Rost-Roszkowska M. 2019. Autophagy and apoptosis in starved and re-fed *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) midgut. Canadian Journal of Zoology 97(4):294–303. DOI: [10.1139/cjz-2018-0104](https://doi.org/10.1139/cjz-2018-0104).
- Włodarczyk A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Ostróžka A, Tarnawska M, Rost-Roszkowska M. 2019. Relationship between ROS production, MnSOD activation and periods of fasting and re-feeding in freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). PeerJ 7:e7399. DOI: [10.7717/peerj.7399](https://doi.org/10.7717/peerj.7399).
- Xie Y, Li J, Kang R, Tang D. 2020. Interplay between lipid metabolism and autophagy. Frontiers in Cell and Developmental Biology 8:431. DOI: [10.3389/fcell.2020.00431](https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00431).
- Yamamoto T, Yasuhara A, Shiraishi H, Nakasugi O. 2001. Bisphenol a in hazardous waste landfill leachates. Chemosphere 42(4):415–418. DOI: [10.1016/s0045-6535\(00\)00079-5](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(00)00079-5).
- Yang Q, Mao Y, Wang J, Yu H, Zhang X, Pei X, Duan Z, Xiao C, Ma M. 2022. Gestational bisphenol a exposure impairs hepatic lipid metabolism by altering mTOR/CRTC2/SREBP1 in male rat offspring. Human & Experimental Toxicology 41:9603271221129852. DOI: [10.1177/09603271221129852](https://doi.org/10.1177/09603271221129852).
- Yin DQ, Hu SQ, Gu Y, Wei L, Liu SS, Zhang AQ. 2007. Immunotoxicity of bisphenol a to *Carassius auratus* lymphocytes and macrophages following *in vitro* exposure. Journal of Environmental Sciences 19(2):232–237. DOI: [10.1016/S1001-0742\(07\)60038-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60038-2).
- Yu J, Yang C, Yu RA, Fu G. 2007. Toxic response of dimethyl phthalate (DMP) to *Gracilaria lemaneiformis*. Electronic Journal of Biotechnology 3(4):80–86.
- Zechner R, Madeo F, Kratky D. 2017. Cytosolic lipolysis and lipophagy: Two sides of the same coin. Nature Reviews Molecular Cell Biology 18(11):671–684. DOI: [10.1038/nrm.2017.76](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.76).
- Zhang D, Zhao K, Han T, Zhang X, Xu X, Liu Z, Ren X, Zhang X, Lu Z, Qin C. 2024. Bisphenol a promote the cell proliferation and invasion ability of prostate cancer cells via regulating the androgen receptor. Ecotoxicology & Environmental Safety 269:115818. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2023.115818](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115818).
- Zhang S, Peng X, Yang S, Li X, Huang M, Wei S, Liu J, He G, Zheng H, Yang L, Li H, Fan Q. 2022. The regulation, function, and role of lipophagy, a form of selective autophagy, in metabolic disorders. Cell Death and Disease 13(2):132. DOI: [10.1038/s41419-022-04593-3](https://doi.org/10.1038/s41419-022-04593-3).

Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*

H. Gorol, Ł. Chajec, G. Wilczek, S. Student, A. Ostróżka & M. Rost-Roszkowska

To cite this article: H. Gorol, Ł. Chajec, G. Wilczek, S. Student, A. Ostróżka & M. Rost-Roszkowska (2026) Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*, The European Zoological Journal, 93:1, 563-582, DOI: [10.1080/24750263.2026.2652113](https://doi.org/10.1080/24750263.2026.2652113)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/24750263.2026.2652113>



© 2026 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



View supplementary material [↗](#)



Published online: 15 Apr 2026.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 99



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*

H. Gorol^a, Ł. Chajec^a, G. Wilczek^a, S. Student^{b,c}, A. Ostróżka^a and M. Rost-Roszkowska^b

^aFaculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Katowice, Poland; ^bFaculty of Automatic Control, Electronics and Computer Science, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland; ^cBiotechnology Center, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is commonly used in the production of plastics and epoxy resins. Hence, it is used to produce many everyday items. It is classified as a hazardous chemical due to its potential to cause serious eye damage, allergic skin reactions, and respiratory irritation or can affect reproductive function, cognitive function, and metabolism. Furthermore, BPA, due to its ability to mimic the human hormone estrogen, is an endocrine disruptor. However, aquatic organisms are most vulnerable to BPA. While changes in the abundance and fecundity of freshwater invertebrates have been analysed, data on the cytotoxic effects of BPA are scarce. Cytotoxicity triggers numerous degenerative or regenerative processes that attempt to maintain homeostasis in the body. Thus, to determine which cytotoxicological processes could be activated after BPA exposure, we used the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*, a species widely cultured worldwide. Individuals of *N. davidi* were exposed to three concentrations of BPA: 1, 5, and 10 mg/L for 24, 48, and 72 h. Isolated from the specimens, the intestine and hepatopancreas were prepared for qualitative and quantitative analysis. The present findings demonstrate that BPA disrupts multiple cytotoxicity pathways, triggering a cascade of cellular interactions, including damage to mitochondria, nuclei, and DNA. We conclude that the oxidant-antioxidant imbalance induced by BPA compromises epithelial cell homeostasis, leading to midgut barrier dysfunction and impairing the regenerative capacity of the digestive system.

ARTICLE HISTORY

Received 1 December 2025
Accepted 24 March 2026

KEYWORDS

BPA; oxidative stress;
cytotoxicity; cell death;
mitochondria

1. Introduction

Bisphenol A is an organic chemical compound widely used in the production of epoxy resins, polycarbonate plastics, and numerous paper products. Consequently, it is present in everyday items such as food containers, medical devices, toys, and receipts. BPA is also detected in soil, water, and air, and its extensive use in plastic manufacturing leads to its accumulation in the environment and living organisms (Careghini et al. 2015; Corrales et al. 2015; Björnsdotter et al. 2017).

There is increasing evidence that the induction of reactive oxygen species (ROS) by BPA contributes to its toxicity and carcinogenicity (Rochester 2013; Gassman & Wilson 2017; Seachrist et al. 2016; Gassman 2017). ROS are toxic byproducts of cellular metabolism and are among the key factors inducing apoptosis through both mitochondria-dependent and -independent pathways (Sinha et al. 2013; Komogashira et al., 2015). Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of ROS and the detoxification of reactive intermediates (Candas & Li 2014). Mitochondria, among other organelles, are responsible for the synthesis of ATP and ROS, as well as for the activation of cell death (Martin 2010; Kamogashira et al. 2015; Włodarczyk et al. 2019; Ostróżka et al. 2025). Changes in mitochondrial ultrastructure can cause changes in the functioning of the entire enzymatic system (Włodarczyk et al. 2019). ROS accumulation can lead to damage of the mitochondrial enzymatic system, which causes changes in mitochondrial membrane potential (Koizumi et al. 1994; Cannino et al. 2009; Rost-Roszkowska et al. 2021), as well as the activation of antioxidant enzymes (Yao et al. 2007; Ramalho-Santos et al. 2009; Włodarczyk et al. 2019; Rost-Roszkowska et al. 2021).

CONTACT M. Rost-Roszkowska  magdalena.rost-roszkowska@us.edu.pl  Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Bankowa 12, Katowice 40-007, Poland

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/24750263.2026.2652113>.

© 2026 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

Thus, impairment of mitochondrial function caused by their damage can lead to disruption of cellular homeostasis (Nunnari & Suomalainen 2012; Xia et al. 2019; Rost-Roszkowska et al. 2021). However, there are many antioxidants that modulate ROS concentrations, influencing the proper functioning of cellular organelles, including mitochondria and the cell nucleus, where DNA damage is prevented (Chelikani et al. 2004; Johnson and Guilivi, 2005; Lubberda 2005; Combelles et al. 2009). Superoxide dismutase (SOD) converts superoxide into hydrogen peroxide and oxygen (Johnson and Guilivi, 2005; Combelles, 2009), catalase and glutathione peroxidase convert hydrogen peroxide into water and oxygen (Brigelius-Flohé 1999; Chelikani et al. 2004; Combelles et al. 2009), and GSH, the reduced form of glutathione, is involved in protection against oxidative damage (Lubberda 2005; Combelles et al. 2009).

Freshwater organisms are highly exposed to BPA due to its widespread use and persistence in freshwater environments. It occurs through contact with BPA-contaminated water, ingestion of BPA-containing food, or absorption through the epidermis, digestive, and respiratory systems. Eventually, BPA exposure negatively impacts aquatic life, resulting in a decline in the animal population. Most studies on BPA toxicity focus on the analysis of population size, reproduction, and fecundity, and the most frequently selected freshwater animals for study are molluscs, crustaceans, and nematodes (Canesi et al. 2005; Crain et al. 2007; Fabbri et al. 2014; Canesi & Fabbri 2015; Siracusa et al. 2018). However, it is important to determine how BPA present in the aquatic environment will affect various cytotoxicity parameters, leading to cell death or triggering repair processes. The freshwater crustacean *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) was selected as the study subject. It is a freshwater shrimp native to Asia, whose presence has also been reported in European rivers, such as the Oder River (Jabłońska et al. 2018). *N. davidi* is widely cultured worldwide as an ornamental aquarium shrimp. Due to its simple body structure, high fecundity, ease of reproduction, and ease of rearing, it is a species that attracts interest among scientists (Sonakowska et al. 2015; Sonakowska-Czajka et al. 2021; Ostróžka et al. 2022, 2024, 2025). Like other crustaceans, it plays a key role in the aquatic ecosystem (Weber & Traunspurger 2016). In our previous studies, we focused on ultrastructural changes and activation of cell death and regenerative processes induced by BPA (Gorol et al., 2025). The aim of this study was to analyse additional cytotoxicological parameters, such as ROS level, DNA damage, and mitochondrial alterations caused by living in BPA-contaminated water. Ultimately, the research aimed to establish whether the oxidant-antioxidant imbalance activated by BPA can impair the homeostasis of epithelial cells.

2. Material and methods

2.1. Material

The material consisted of adult specimens of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca), obtained from local breeders. Our previous studies on this species showed no differences between males and females when the animals were exposed to various stressors (Włodarczyk et al. 2017, 2019; Ostróžka et al. 2022, 2024, 2025; Gorol et al. 2025); therefore, adults of both sexes were selected for the study. The shrimps were bred in a 105 L aquarium under constant conditions, with mechanical filtration and a thermostatic heater. The water temperature was 21°C, pH = 7, and water hardness (GH) = 10. The containers with shrimp were continuously oxygenated using filters with an aeration function that are dedicated to shrimp breeding. The shrimp were fed *ad libitum* with JBL Novo Prawn (Sonakowska et al. 2015, 2016; Włodarczyk et al. 2017, 2019; Ostróžka et al. 2024; Gorol et al. 2025). The described culture was carried out continuously throughout the experiment.

2.2. Experiment

The study was a continuation of the experiment described by Gorol et al. (2025), so the animals were divided into the same experimental groups where we analysed the intestine and hepatopancreas separately (Figure 1). Individuals selected from the culture were exposed to three concentrations of BPA (1, 5, and 10 mg/L) for 24, 48, and 72 h. The BPA concentrations and experimental times were selected based on the literature concerning similar experiments including animals survival (Castritsi-Catharios et al. 2013; Gerhardt 2019; González-Olalla et al. 2024; Liang et al. 2024). The exposure solutions were prepared by dissolving bisphenol A in water using a sonicator. Experimental

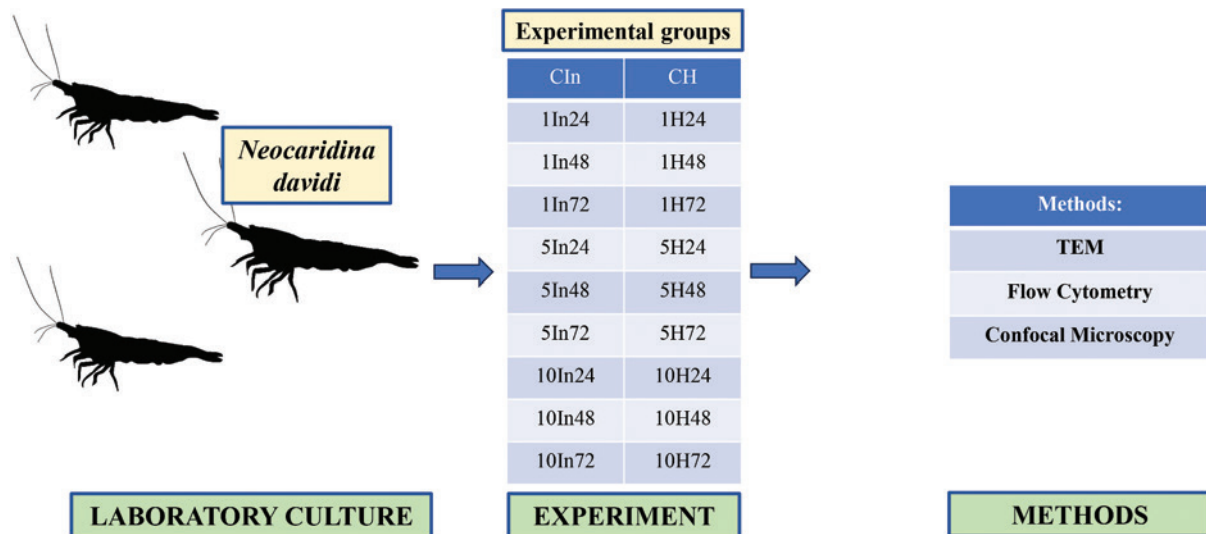


Figure 1. Diagrammatic representation of the experiment: *N. davidi* cultured in different concentrations of BPA.

Table 1. Experimental groups of *N. davidi* exposed to BPA.

BPA concentration/ Period	Intestine			Hepatopancreas		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0 mg/L		CIn			CH	
1 mg/L	1In24	1In48	1In72	1H24	1H48	1H72
5 mg/L	5In24	5In48	5In72	5H24	5H48	5H72
10 mg/L	10In24	10In48	10In72	10H24	10H48	10H72

groups are presented in Table 1. Additionally, two control groups were examined: CIn (intestine) and CH (hepatopancreas). The control group consisted of shrimp raised in non-polluted aquarium water. The experimental animals were cultured separately in 0.5 L containers, with one individual per container, to eliminate competition between individuals. Excrement was removed from the bottom of the container every 12 h. The control and experimental groups were cultured continuously, and fresh water with or without BPA was prepared for each group. All individuals in both the control and experimental groups were fed JBL Novo Prawn *ad libitum*.

2.3. Methods

Before sectioning, the animals were anesthetized with CO₂, and then their intestines and hepatopancreas were isolated. For each method, five adult specimens from each control and experimental group were used. According to our previous studies, the research was conducted regardless of the sex of the individuals, as no differences were found in the course of the experiment between males and females (Włodarczyk et al. 2017, 2019; Ostróżka et al. 2022, 2024; Gorol et al. 2025).

2.3.1. Light and transmission electron microscopy

Organs isolated from 10 *N. davidi* specimens of all experimental groups were fixed, washed, dehydrated, and embedded in epoxy resin (Epoxy Embedding Medium Kit; Sigma) according to the standard protocol described in our previous papers (Rost-Roszkowska et al. 2020a, 2020b, 2022). After cutting ultrathin sections (70 nm), the sections were contrasted using the standard method (Rost-Roszkowska et al. 2020a, 2020b; Poprawa et al. 2022) and analysed with the Hitachi H500 and Quanta FEG250 transmission electron microscopes.

2.3.2. Qualitative analysis – confocal microscopy

Confocal microscopy was used for the qualitative analysis of changes observed in organs isolated from *N. davidi* individuals across all experimental groups. For each of the qualitative methods described below, organs were isolated from five individuals. The dissected organs were subjected to the procedure without fixation (vital analysis).

JC1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iodide) staining JC-1 is a membrane-permeant cationic dye that is commonly used for the detection of changes in mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi$). JC-1 differentiates cells with a high mitochondrial potential (orange fluorescence; polarized mitochondria) and a low mitochondrial potential (green fluorescence; depolarized mitochondria) (Salvioli et al. 1997). The isolated organs were incubated in the dark with 5 μ L of 1.5 mM JC-1 solution in DMSO (99.97%, $H_2O < 0.1\%$) for 15 min at room temperature (RT), followed by DAPI staining (30 min, RT, darkness). After washing in TBS, the material was visualized using an Olympus FluoView FV3000 confocal laser scanning microscope. Signals were collected in the range of 430–470 nm for DAPI and 500–600 nm and 570–670 nm for JC-1.

ThiolTracker Violet is commonly used to estimate the cellular level of reduced glutathione (GSH), a key mechanism of cellular detoxification. Dissected organs were stained with ThiolTracker Violet (10 μ M) according to the manufacturer's protocol (<chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10095.pdf>) and DAPI (1 μ g/mL, 30 min, RT, in the dark). After washing the material with PBS, it was examined using an Olympus FluoView FV3000 confocal laser scanning microscope. Signals were collected in the range of 430–470 nm for DAPI and 500–600 nm for ThiolTracker Violet.

2.3.3. Quantitative analysis – flow cytometry

The dissected intestine and hepatopancreas were mechanically fragmented and gently crushed in 200 μ L of cold PBS (pH 7.4) buffer using a mechanical homogenizer (BEAD BUG MICROTUBE HOMOGENIZER). Cells were acquired shortly after the preparation of samples. The cell suspension was washed using centrifugation at 1500 rpm for 5 min, and the precipitate was resuspended in 100 μ L of PBS buffer. The cell suspension was filtered through a 40–100 μ m sterile cell strainer (Thermo Fisher, Falcon Cell Strainers) and suspended in 100 μ L of PBS buffer. To obtain a sample size of 5 for statistical analysis, five cell suspensions from each experimental group were prepared. The cell suspension was then treated according to the manufacturer's protocol for each method described below.

The **Muse Oxidative Stress Kit** (Merck Millipore, № MCH100111) enables quantitative analysis of the differentiated population of ROS- and ROS+ cells. The procedure was conducted according to the manufacturer's protocol (<chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-Oxidative-Stress-Kit-RSP.pdf>), and the measurements were performed using the Muse Cell Analyzer (Millipore) (Ostróžka et al. 2024).

The **Muse Annexin V & Cell Death Kit** (Cytek, SKU MCH100105) enables the quantitative analysis of live, early, and late apoptosis, as well as necrosis. The material was stained and prepared for analysis according to the manufacturer's protocol (<chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-Annexin-V-&Dead-Cell-Kit-RSP.pdf>). The measurements were performed using the Muse Cell Analyser.

The **Muse MultiCaspase Kit** (Cytek, MCH100109) differentiates live/caspase(-), live/caspase(+), dead/caspase(+), and dead/caspase(-) cells. The quantitative analysis enables the determination of the relative percentages of live, caspase-active, and dead cells (resulting from apoptosis and necrosis), as well as the involvement of apoptotic caspases in cellular function. The quantitative analysis was conducted according to the procedure presented in the manufacturer's protocol (<https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-MultiCaspase-Kit-RSP.pdf>) (Ostróžka et al. 2024).

The **Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit** (Cytek, SKU MCH200105) enables the measurement of total and phosphorylated Bcl-2 protein using two antibodies: a phospho-specific anti-phospho-Bcl-2 (Ser70)-Alexa Fluor 555 and an anti-Bcl-2-PECy5 conjugated antibody. The quantitative analysis of inactivated cells, cells activated via phosphorylation, and non-expressing cells was conducted according to the manufacturer's protocol (<https://cytekbio.com/products/muse-bcl-2-activation-dual-detection-kit?variant=40651391008804>). The measurements were performed using the Muse Cell Analyser.

The **Muse Multi-Color DNA Damage Kit** (Cytex, MCH200107) enables investigation of the DNA damage response through the ATM-dependent signalling pathway. Measuring the percentage of negative cells (no DNA damage), ATM-activated cells, X2A.X-activated cells, and DNA double-strand breaks was conducted following the manufacturer's protocol (<https://welcome.cytexbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/muse-multi-color-dna-damage-kit-rsp.pdf>). The measurements were performed using the Muse Cell Analyser.

2.3.4. Statistical analysis

The statistical analyses were conducted using the STATISTICA 13.3 software. The normality of the data was assessed using the Shapiro–Wilk test. Levene's test was applied to check the homogeneity of variance. To evaluate the significance of differences in the levels of quantitative parameters across experimental groups, considering the studied concentrations of bisphenol A and applied stress factors, the Tukey test was used ($p < 0.05$). Additionally, to assess the significance of differences in parameter levels with respect to organ type and treatment across experimental groups, both one-way and two-way analyses of variance (ANOVA/MANOVA) were performed.

3. Results

3.1. ROS

Regardless of the BPA concentration and the organ examined, the highest percentage of ROS-positive cells was observed after 24 h of exposure to the xenobiotic. In both organs, the level of ROS-positive cells at this time point was, on average, twice as high as in the control group (Figure 2). Prolonged exposure to higher concentrations of BPA did not result in a significant increase in ROS compared to the control.

3.2. Cell death

No statistically significant differences were observed in the percentage of early apoptotic cells in the hepatopancreas, regardless of the exposure duration or BPA concentration. In the midgut, the highest percentage of early apoptotic changes was recorded after 72 h of exposure to the highest BPA concentration (Figure 3(A)), with a fourfold increase compared to the control group. Additionally, exposure to the lowest concentration of BPA resulted in a statistically significant, approximately twofold increase in the percentage of early apoptotic cells at all exposure durations (Figure 3(A)). In the intestine, no significant differences were observed in the percentage of late apoptotic cells following exposure to the BPA. In contrast, the hepatopancreas showed an almost fourfold increase in the percentage of late apoptotic cells across all exposure durations and concentrations, compared to the control (Figure 3(B)). The percentage of necrotic cells in the midgut was highest after 24-h exposure to 5 mg/L BPA, reaching nearly five times the control level. Similar changes were observed in the hepatopancreas at this concentration, with statistically significant differences compared to the control noted at all exposure times (Figure 3(C)).

The lowest percentage of viable cells was recorded in the intestine of individuals exposed to BPA at the highest concentration (10 mg/L) for 72 h. In this organ, the level of this parameter was 17% lower than in the control group (Figure 4(A)). The highest percentage of caspase-positive viable cells on average – 10 times higher than in the control group – was observed in the intestine following a 72-h exposure to BPA at a concentration of 10 mg/L (Figure 4(B)). Lower concentrations of BPA also caused a significant increase in the proportion of these cells in the intestine, with values approximately twofold higher than in the control after 24 and 48 h of exposure (Figure 4(B)). This organ also exhibited a significant increase in the percentage of dead caspase-positive cells compared to the control after 48 h of exposure to BPA at 1 mg/L, as well as an increase in dead cells after 24 and 72 h of exposure at 5 mg/L (Figure 4(C–D)). Additionally, a statistically significant decrease in the percentage of dead cells was observed in the intestine after exposure to the highest concentration of BPA at both 48 and 72 h, relative to the control (Figure 4(D)). No significant changes were recorded in any of the analysed parameters in the hepatopancreas of exposed individuals (Figure 4(A–D)).

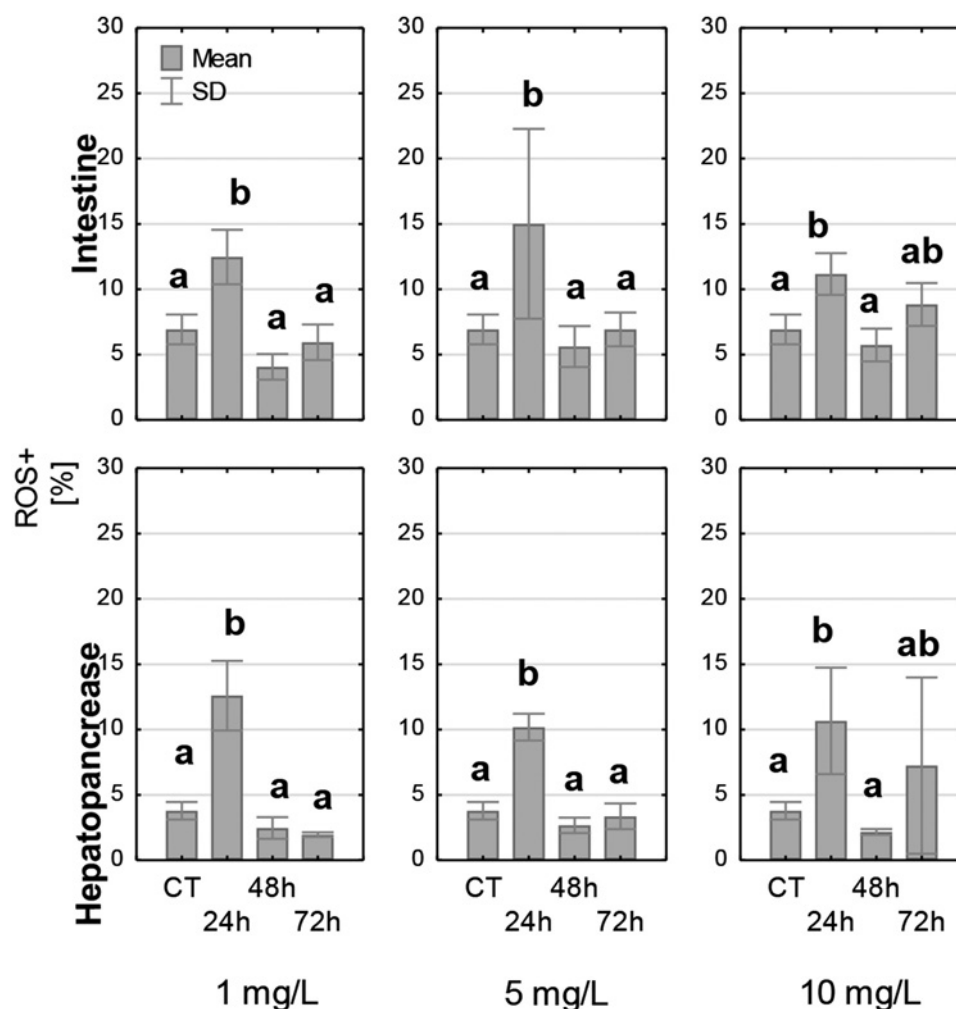


Figure 2. The percentage of ROS-positive cells in the intestine and hepatopancreas of individuals from control groups (CT) and exposed to BPA for 24 h, 48 h, or 72 h. Different letters (a, b) indicate statistically significant differences among groups within each concentration and organ (Tukey's test, $p < 0.05$).

The highest percentage of Bcl-2-activated cells was observed in the intestine after 48 h of exposure to BPA at a concentration of 1 mg/L. A significant increase in the proportion of activated intestinal cells was also observed after 72 h of exposure to BPA at a concentration of 10 mg/L, with the changes being nearly four times higher compared to the control group. In contrast, no significant differences were observed in the hepatopancreas with respect to this parameter when compared to the control (Figure 5(A)). In both the intestine and hepatopancreas, regardless of the BPA concentration or exposure duration, the percentage of Bcl-2-inactivated cells remained similar to that of the control group (Figure 5(B)). BPA at a concentration of 1 mg/L induced a significant, nearly twofold increase in the proportion of cells lacking marker expression in both intestinal and hepatopancreatic tissues compared to the control. However, after 72 h of exposure, the percentage of such cells in the hepatopancreas decreased, reaching approximately half the control value at the same concentration. Exposure to higher concentrations of BPA at both time points did not induce comparable changes, as the values of this parameter remained close to those observed in the control group (Figure 5(C)).

3.3. DNA damage

Transmission electron microscopy revealed that in both midgut organs in animals exposed to BPA for 48 and 72 h, the nuclear envelope was distended, and within the nucleus, chromatin formed electron-dense patches that were larger than those in the control group. These changes were dominant after 48 h of the experiment

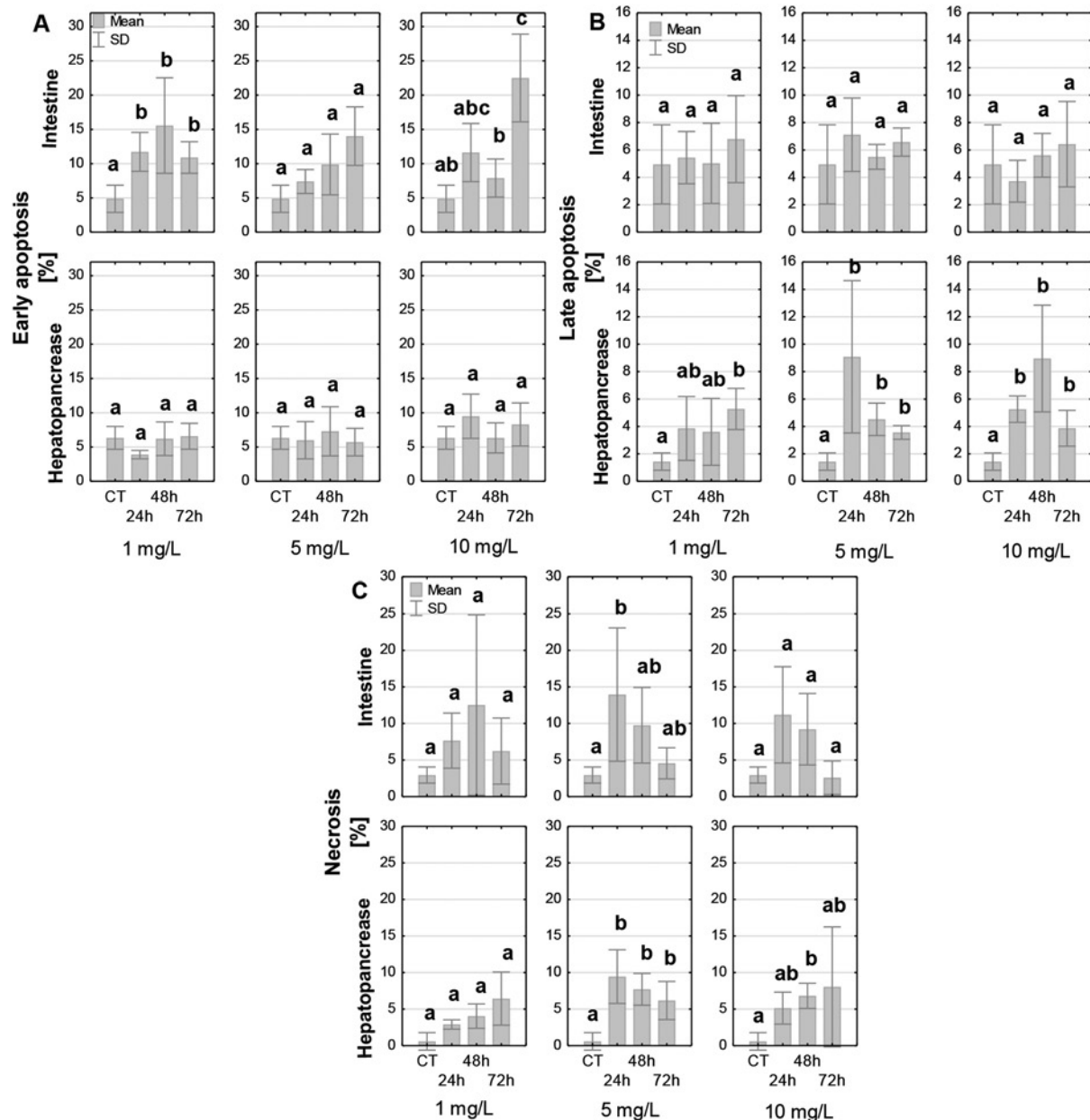


Figure 3. The percentage of early apoptosis (A), late apoptosis (B), and necrosis cells (C) in the intestine and hepatopancreas of individuals from control groups (CT) and exposed to BPA for 24 h, 48 h, or 72 h in cells of the analysed organs. Different letters (a, b, c) indicate statistically significant differences among groups within each concentration and organ (Tukey's test, $p < 0.05$).

(Figure 6(A–F)). Additionally, lamellar structures were observed in several nuclei of D-cells in the intestine (Figure 6(B)). At each of the applied BPA concentrations, a significant increase in the percentage of cells with DNA damage in the hepatopancreas was observed after 48 h of exposure, compared to the control. In this organ, the levels of DNA-damaged cells at the other time points were nearly twofold lower and comparable to those in the control group. Similar trends were observed in the intestine (Figure 6(G)).

3.4. Mitochondrial activity

Analysis using the JC1 reagent showed that in both organs that form the midgut (intestine and hepatopancreas), the number of green signals emitted by depolarized, inactive mitochondria increases according to increasing concentration and prolonged time of BPA exposure. Only in the intestines of animals from the

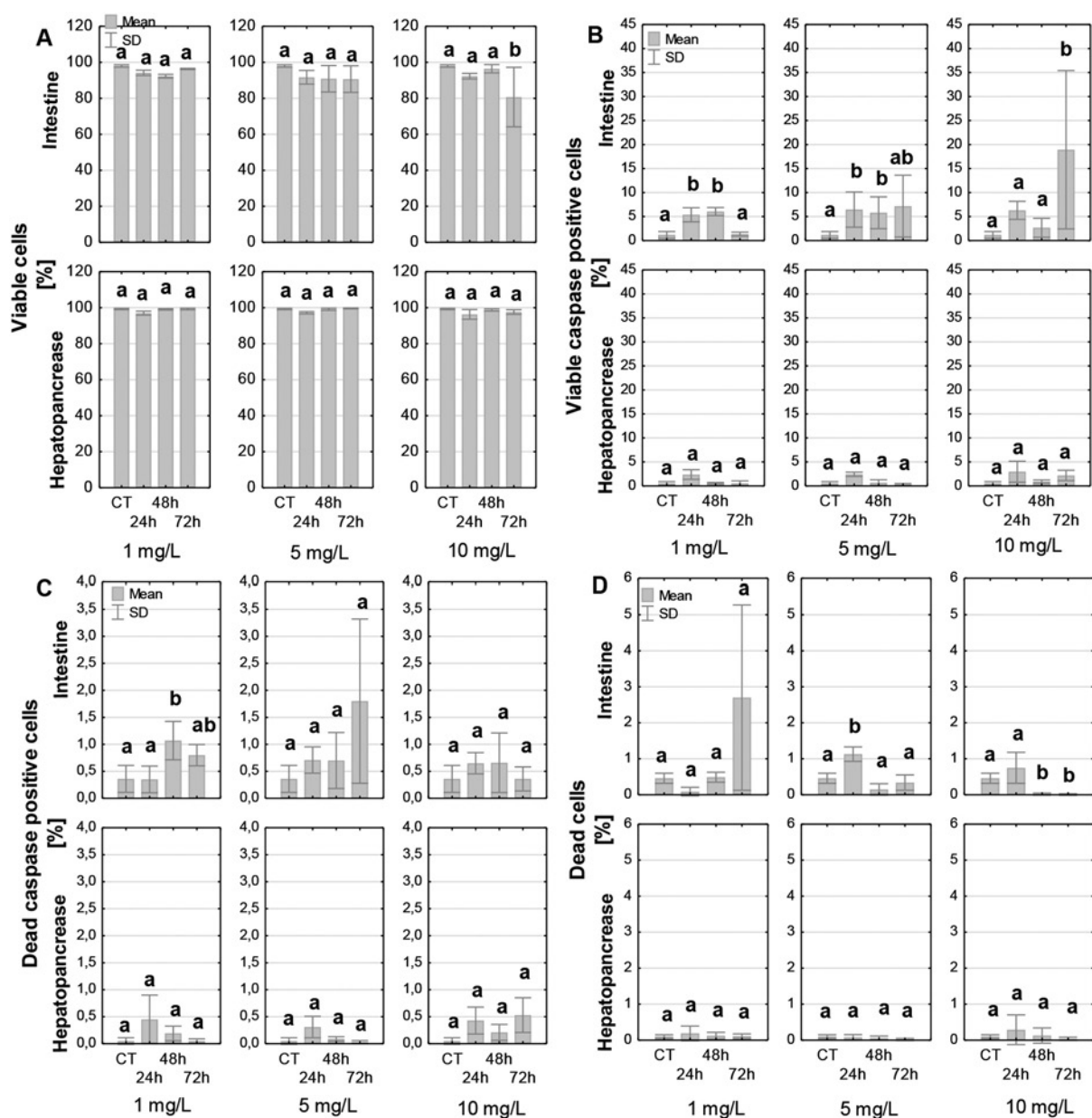


Figure 4. The percentage of viable cells (A), viable caspase-positive cells (B), dead caspase-positive cells (C), and dead cells (D) in the intestine and hepatopancreas of individuals from control groups (CT) and exposed to BPA for 24 h, 48 h, or 72 h in cells of the analysed organs. Different letters (a, b) indicate statistically significant differences among groups within each concentration and organ (Tukey's test, $p < 0.05$).

5In48 group was a strong increase in signals emitted by active mitochondria detected (Figure 7). Transmission electron microscopy revealed numerous changes in the fine structure of mitochondria in all experimental groups. Bloated mitochondria with damaged membranes, electron-lucent mitochondrial matrix, or with short crista occurred (Figure 8(A–I)).

3.5. GSH

ThiolTracker Violet staining revealed that the cellular level of reduced glutathione (GSH) increased in both the intestinal epithelium and the hepatopancreas following prolonged BPA exposure at 24 and 48 h. However, in animals cultured in a concentration of 5 mg/L, a weaker GSH signal was detected in the 5In48

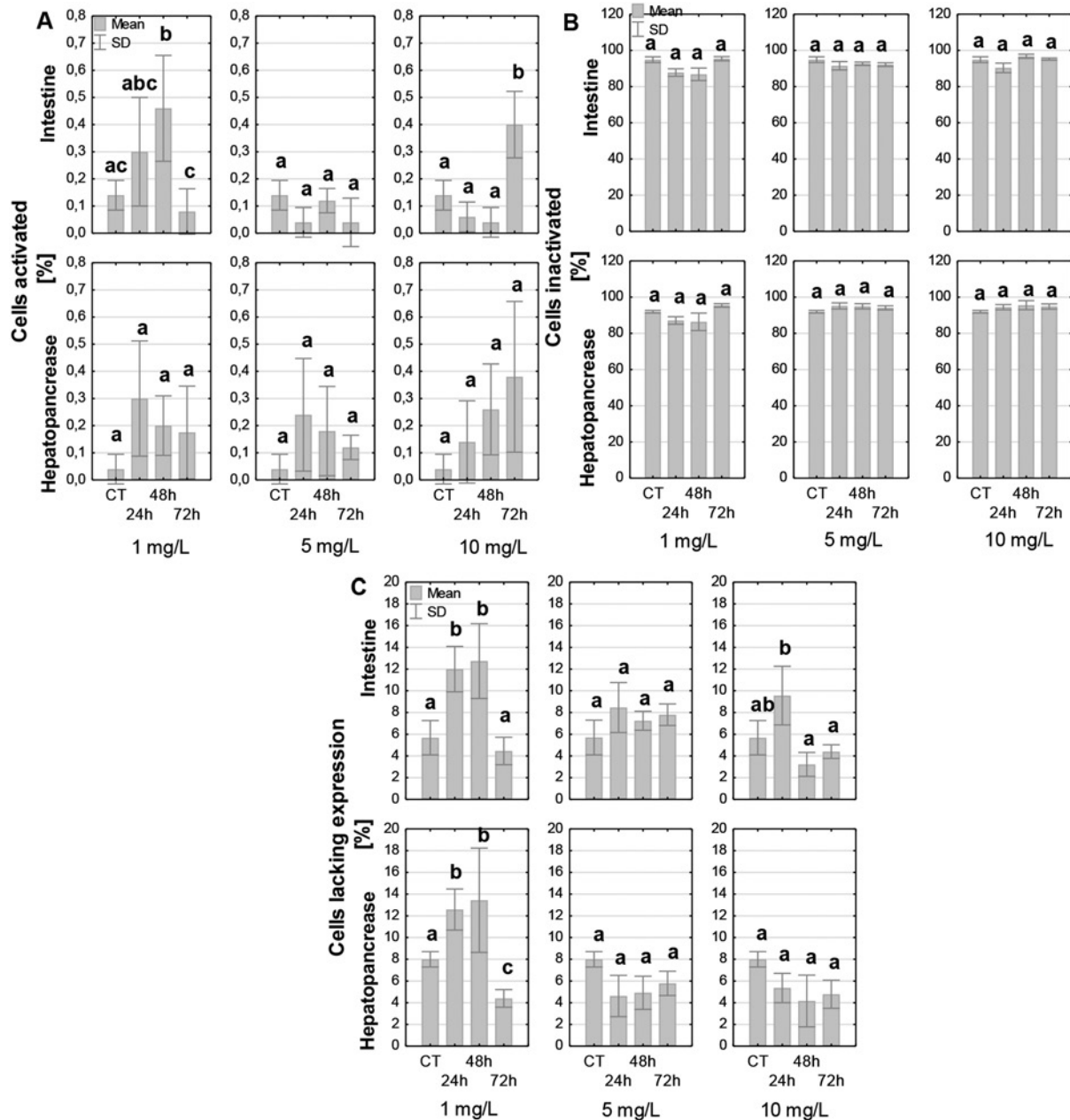


Figure 5. The percentage of Bcl-2-cells activated (A), Bcl-2-cells inactivated (B), and cells lacking expression of Bcl-2 (C) in individuals from control groups (CT) and exposed to BPA for 24 h, 48 h, and 72 h in cells of the analysed organs. Different letters (a, b, c) indicate statistically significant differences among groups within each concentration and organ (Tukey's test, $p < 0.05$).

experimental group. After 72 h, a decrease in the intensity of GSH signals was observed, which was particularly noticeable in the hepatopancreas (Figure 9).

Among the analysed grouping factors – BPA exposure duration (T), BPA concentration (C), and organ type (O) – exposure duration (T) exerted the strongest influence on the variability of all measured parameters across the experimental groups (Supplementary material, Tables S2 and S3). For parameters reflecting the status of Bcl expression and caspase-dependent cell states, statistically significant interactions were observed between exposure duration (T) and organ type (O), and between BPA concentration (C) and organ type (O). The combined effect of all three factors was most pronounced in relation to the levels of parameters describing caspase-dependent cellular states (Supplementary material, Table S2). In the case of parameters related to apoptotic and necrotic

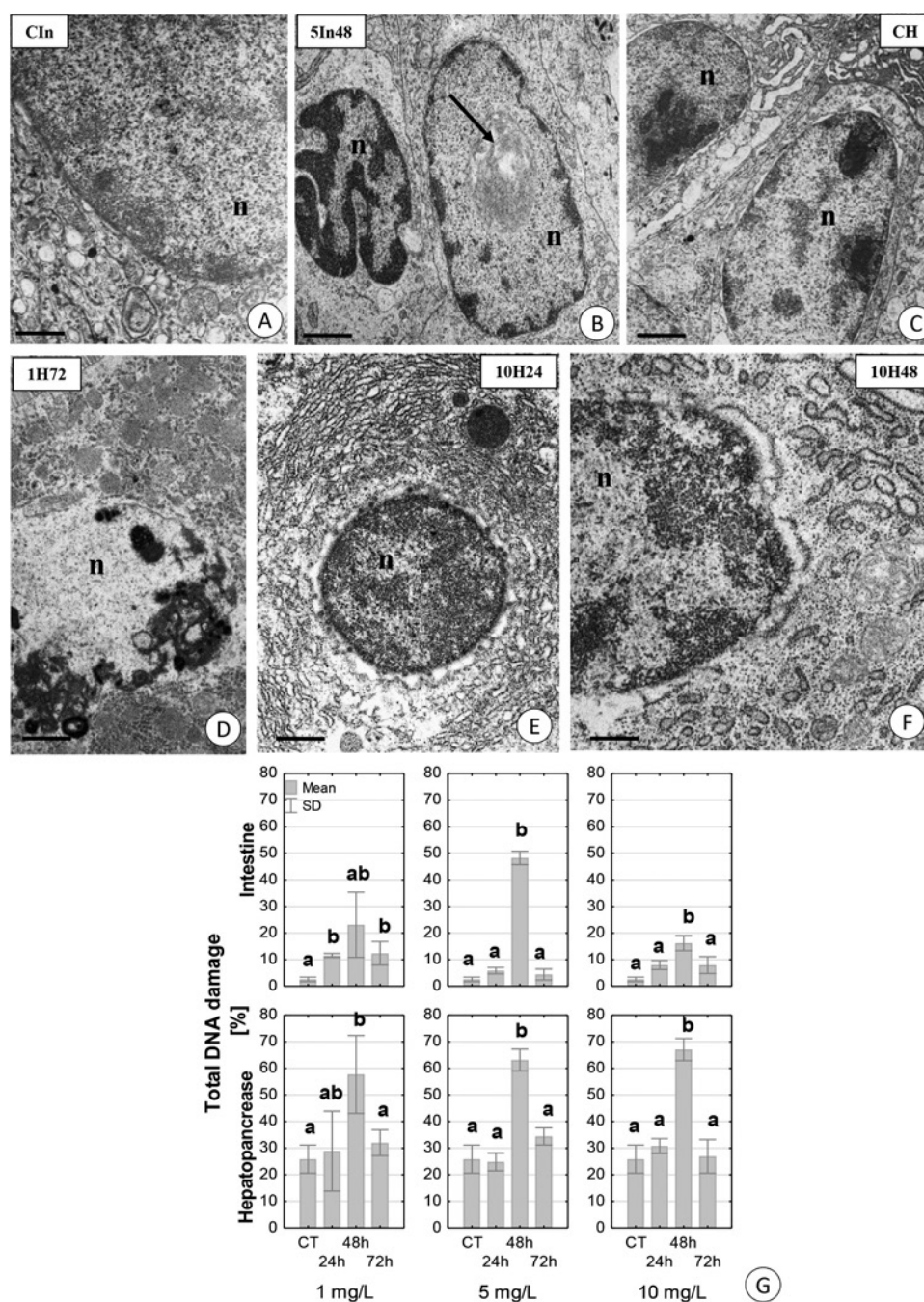


Figure 6. (A–F) nuclei (n) in selected experimental groups of *N. davidi* exposed to BPA. Lamellar structures (arrow). TEM. (A) Scale bar = 0.8 μ m. (B) Scale bar = 1.2 μ m. (C) Scale bar = 1.2 μ m. (D) Scale bar = 1 μ m. (E) Scale bar = 0.9 μ m. (F) Scale bar = 0.7 μ m. (G) The percentage of cells with total DNA damage in the intestine and hepatopancreas of individuals from control groups (CT) and exposed to BPAA for 24 h, 48 h, or 72 h. Different letters (a, b) indicate statistically significant differences among groups within each concentration and organ (Tukey's test, $p < 0.05$).

changes, ROS levels, DNA damage, and organ type, in addition to exposure duration, showed a significant impact on parameter variability (Supplementary material, Table S3). A statistically significant influence of all three differentiating factors – both in terms of two-way interactions and their combined effect – was observed only for the percentage of cells with DNA damage.

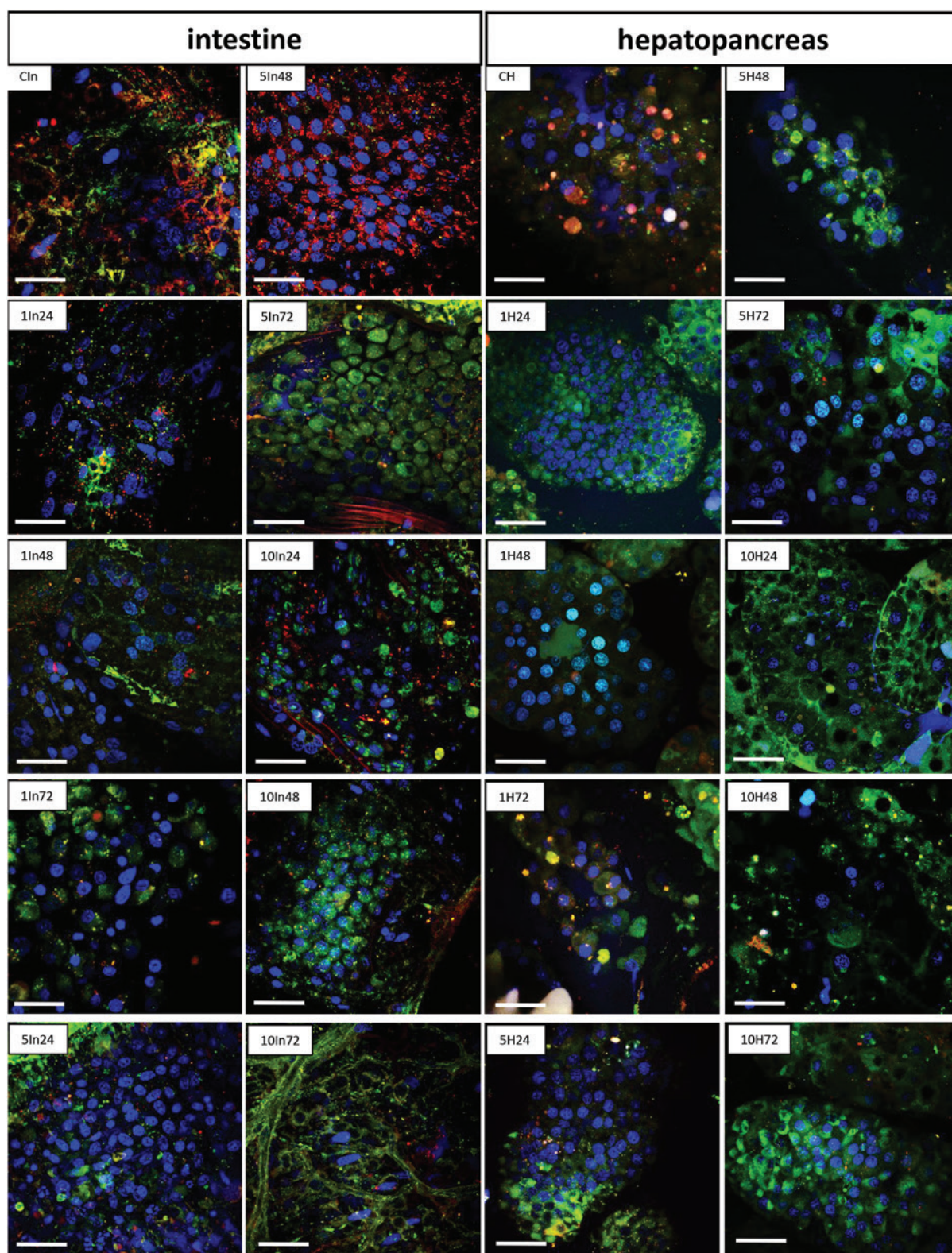


Figure 7. 3D representation of the localization of active mitochondria with the high membrane potential (red signals), inactive mitochondria with a low membrane potential (green signals), and nuclei (blue signals). Intestine and hepatopancreas of *N. davidi*. JC-1 cationic dye (red/green signals), DAPI (blue signals) staining. Confocal microscope. Scale bars = 40 μm.

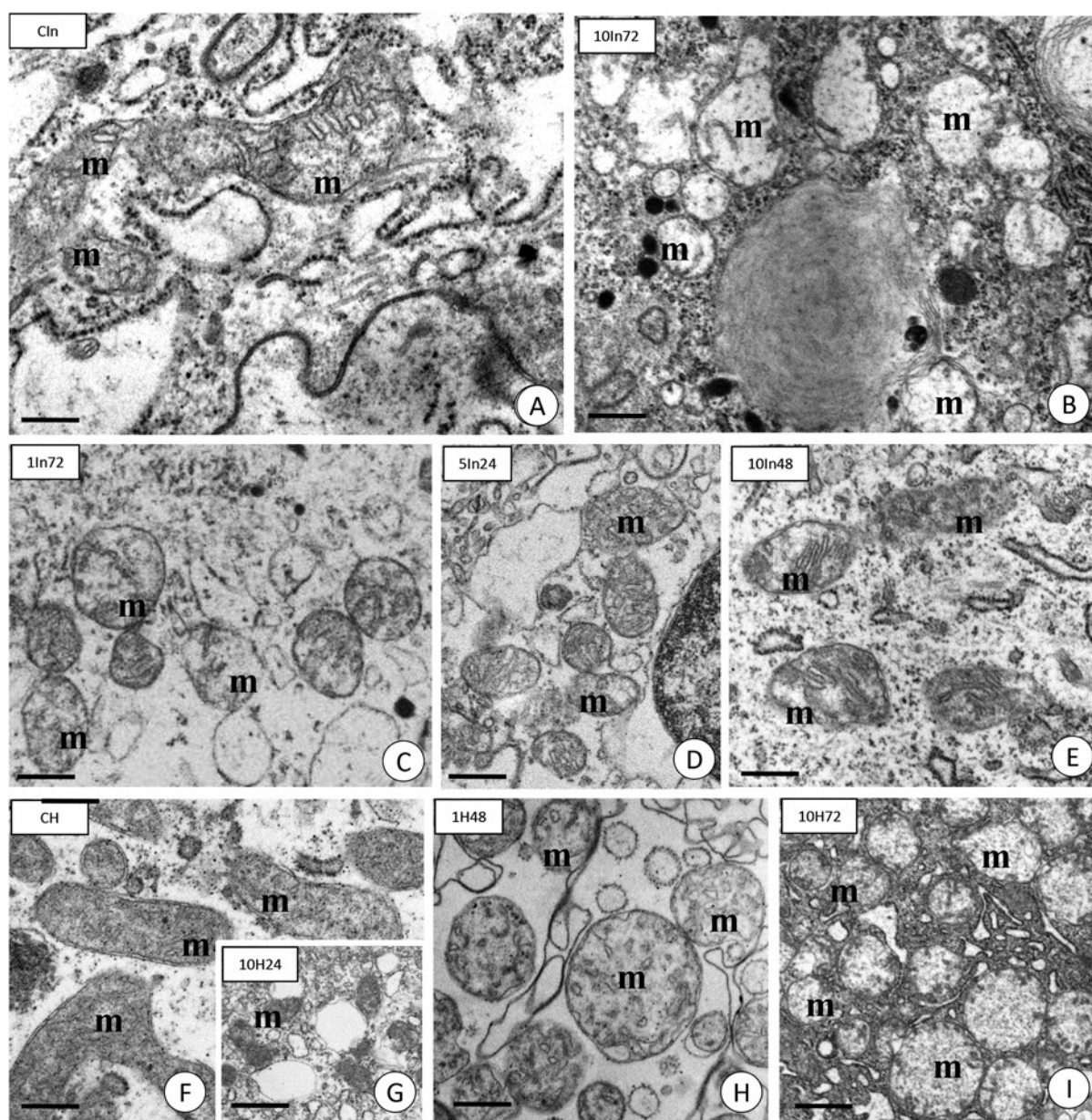


Figure 8. Mitochondria (m) in selected experimental groups of *N. davidi* exposed to BPA. TEM. (A) Scale bar = 0.3 μ m. (B) Scale bar = 0.3 μ m. (C) Scale bar = 0.3 μ m. (D) Scale bar = 0.4 μ m. (E) Scale bar = 0.3 μ m. (F) Scale bar = 0.2 μ m. (G) Scale bar = 0.4 μ m. (H) Scale bar = 0.2 μ m. (I) Scale bar = 0.2 μ m.

4. Discussion

The midgut of invertebrate animals is an organ that, in direct contact with ingested food, constitutes one of the first barriers preventing harmful substances from entering the body (Beaty et al. 2002; Ostróžka et al. 2022; Zeng et al. 2022, Rost-Roszkowska et al., 2020a, 2022; Rost-Roszkowska et al. 2025). These substances, once they penetrate the intestinal epithelium, can damage it and then enter other organs of the body. However, to maintain homeostasis in the digestive system and throughout the body, various mechanisms are activated to protect the midgut epithelial cells from damage (Chen et al. 2022). One such process is cell death, specifically apoptosis. This process is primarily induced by two pathways: the extrinsic pathway, associated with membrane receptors, and the intrinsic pathway, associated with mitochondria. In both cases, proteolytic enzymes belonging to the caspases are activated (Genchi et al. 2020; Mustafa et al. 2024; Vogler et al. 2025). The intrinsic pathway is regulated by both pro- and anti-apoptotic factors, which belong to the

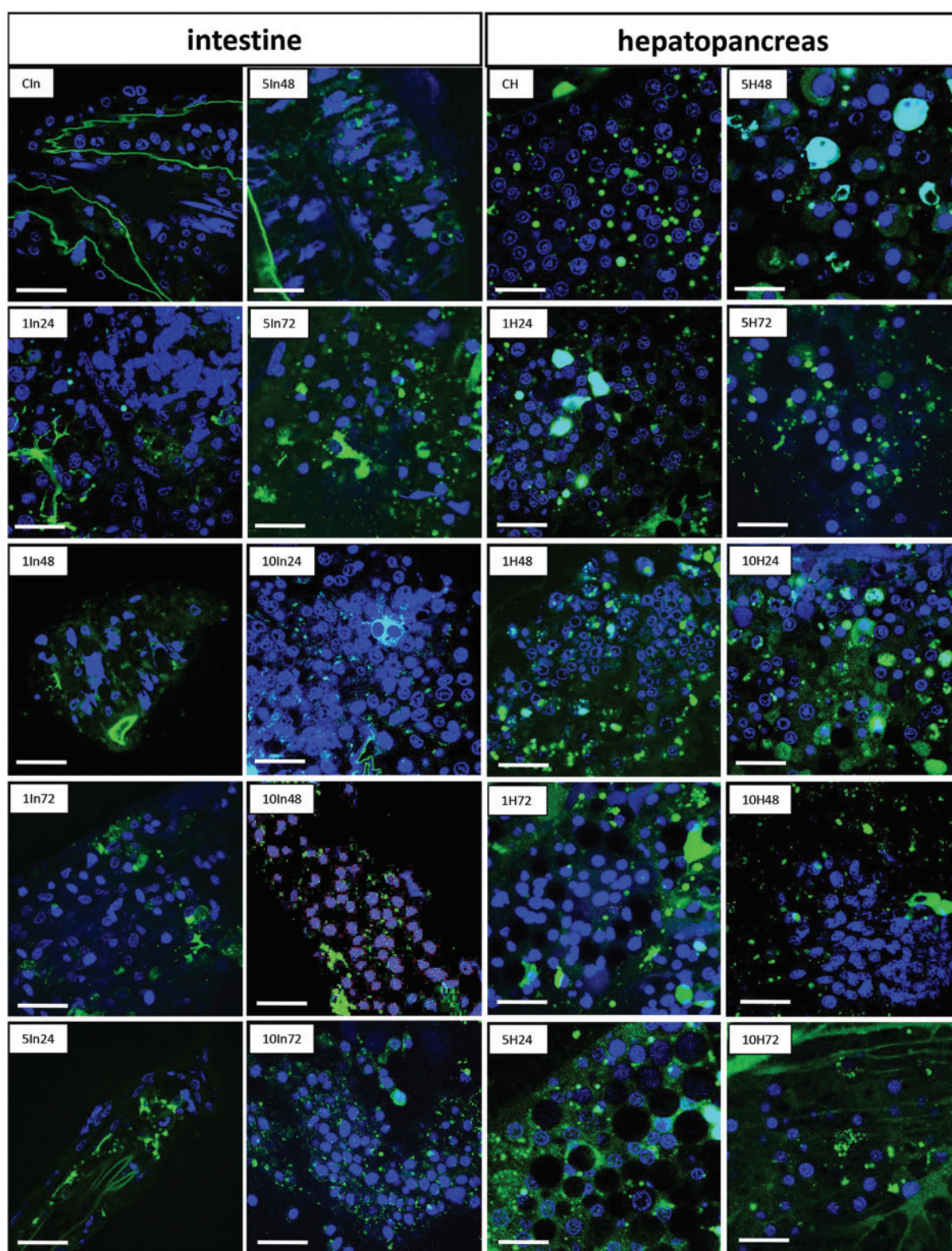


Figure 9. 3D representation of ThiolTracker Violet and DAPI staining of *N. davidi* intestine and hepatopancreas. Confocal microscopy revealed the cellular localization of reduced GSH (green signals) and nuclei (blue signals, DAPI). Scale bars = 40 μ m.

Bcl-2 protein family (Singh et al. 2019). Anti-apoptotic Bcl-2 is the key regulator of mitochondrial activity through the mitochondrial outer membrane permeabilization (Vaux et al. 1988; Petros et al. 2004; Warren et al. 2019; Nguyen et al. 2024; Vogler et al. 2025). BPA is a toxic substance that induces apoptosis in many cells, causing damage to cell organelles and leading to cell death (Qu et al. 2018; Wang et al. 2019; Zhao et al. 2019; Chen et al. 2022; Yang et al. 2025). In *N. davidi*, BPA induces cell death via both necrosis and apoptosis. The increase in apoptosis is particularly noticeable in the hepatopancreas, while in the intestine, changes are most evident at the highest BPA concentration in water. Necrosis, however, is the dominant process in both analysed organs. This is confirmed by studies examining the number of cells in which caspase activation occurred; these changes are not statistically significant. Many caspases are proteins involved in both the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis (Genchi et al. 2020; Mustafa et al. 2024; Vogler et al. 2025). Necrotic changes are accompanied by changes in organelles at the ultrastructural level and may be connected with inflammation (Rost-Roszkowska et al. 2010, 2020a, 2020b; Chajec et al. 2012; Gowda & Kokila 2017). Necrosis in adult *N. davidi* intestine and hepatopancreas during the physiological state was precisely described by Sonakowska et al. (2016). Cell death is also a common process in the midgut epithelium of *N. davidi* larvae (Sonakowska-Czajka et al. 2021). Necrotic cytoplasmic alterations, including changes in mitochondria and nuclei, were detected in freshwater shrimp cultured in BPA-contaminated water. Statistically insignificant changes in the level of the antiapoptotic protein Bcl-2 confirmed the minimal involvement of apoptosis in the degenerative processes induced by BPA. Bcl-2 is activated to prevent cells from undergoing apoptosis (Warren et al. 2019; Nguyen et al. 2024; Vogler et al. 2025). Necrosis is markedly more destructive to tissue and the entire organism, and, unlike controlled apoptosis, it is a random, catastrophic process that invariably triggers inflammation (Majno & Joris 1995; Gowda & Kokila 2017; Bertheloot et al. 2021).

Apoptosis may be activated in response to oxidative stress induced by increased ROS levels (Ryter et al. 2007; Schieber & Chandel 2014; Rost-Roszkowska et al. 2022; Ostróžka et al. 2024). However, different mechanisms may be involved in ROS neutralization to protect cells against death. The key role in antioxidant processes is fulfilled by enzymes, e.g. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxiredoxins, and glutathione peroxidase (GPx) (Srinivasan & Avadhani 2012; Perkins et al. 2015; Rost-Roszkowska et al. 2021, 2022; Kozlov et al. 2024; Tumilaar et al. 2024; Gulcin 2025; Kvedariene et al. 2025). In *N. davidi*, BPA caused an increase in ROS levels in both analysed organs only after 24 h of the experiment at all concentrations. However, prolonged exposure to contaminated water led to a marked decrease in ROS level. This phenomenon was observed regardless of the BPA concentration in water. Similar activation of ROS production has been reported in other freshwater invertebrates, including freshwater crustaceans, e.g. *Macrobrachium nipponense* (Zhao et al. 2024; Liu et al. 2025), *Artemia franciscana* (Castritsi-Catharios et al. 2013), and *Procambarus clarkii* (Zhang et al. 2020).

Damage to cell organelles such as mitochondria or nuclei indicates that oxidative stress has occurred (Guo et al. 2013; Coluzzi et al. 2014; Xu et al. 2025). However, ultrastructural damage may be caused not only by increased ROS levels but also by other free radicals (Chandimali et al. 2025). Free radicals or pro-oxidants are classified into two types: reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). ROS oxidants are classified into superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$), peroxy radicals ($ROO^{\bullet}$), hydroxyls ($OH^{\bullet}$), and hydrogen peroxide (H_2O_2), while nitrogen oxide ($NO^{\bullet}$) and peroxynitrite ($NO_3^{\bullet}$) belong to RNS oxidants (Sies et al. 2022). In *N. davidi*, changes in mitochondria at the ultrastructural level occur under the influence of BPA, which indicates that these organelles are stressed. Additionally, changes in mitochondrial membrane potential occur, which are associated with decreased mitochondrial activity (Kroemer et al. 2007; Yaprıtseva et al. 2024). An increase in the number of degenerated mitochondria as a result of exposure to a stressor was observed in *N. davidi* shrimps subjected to starvation (Włodarczyk et al. 2019), exposed to dimethoate (Ostróžka et al. 2022), or nickel (Ostróžka et al. 2025). In addition to damaging mitochondria, BPA also induces DNA damage, having a strong genotoxic and mutagenic effects (Susiarjo et al. 2013; Di Pietro et al. 2020; Perin et al. 2022). In the studied shrimp, an increase in DNA damage and degenerative changes in the nucleus structure was observed with increasing duration of the experiment (mainly after 48 h) and increasing BPA concentration. Our previous studies on *N. davidii* cultured in BPA-contaminated water showed no significant change in the percentage of cells in the S phase of the intestine after BPA exposure compared with the control, whereas a significant reduction in DNA synthesis was detected in the hepatopancreas (Gorol et al. 2025). Summarizing our studies on *N. davidi* exposed to BPA-contaminated water, we suggest that damaged DNA and mitochondria cannot be regenerated, indicating that BPA is a highly toxic substance (Karzi et al. 2023). In numerous freshwater and marine invertebrates, the effect of BPA on the

activation of damage to cell organelles, such as mitochondria or the nucleus, has been described as an effect of oxidative stress (Park & Choi 2009; Neighmond et al. 2023; Abd Elkader & As 2023; Abidi et al. 2026). Since our studies examined only changes in ROS levels, it is difficult to determine whether the increased levels of other oxidants were due to BPA. Therefore, it is necessary to conduct further research on the activation of oxidants other than ROS that cause oxidative stress by BPA.

Additionally, our GSH ((γ -glutamyl-cysteinyl-glycine)-related results from this experiment support this suggestion. GSH is likely one of the antioxidants involved in reducing this stress (Kvedariene et al. 2025). It participates in regulating mitochondrial membrane permeabilization, preventing mitochondrial degeneration or inactivation (Franco & Cidlowski 2009; Marí et al. 2009; Golbidi et al. 2014; Ribas et al., 2014; Marí et al. 2020; Dawood & Abaas 2022). Although GSH is a key mitochondrial antioxidant, its level must be regulated to avoid disruption of normal cellular processes, which can lead to dysfunction. Thus, under oxidative stress, GSH will act as a protective antioxidant. However, in the absence of a stressor, elevated GSH levels can lead to mitochondrial damage (Fernández-Checa et al. 2005; Chen et al. 2024). A continuous increase in GSH level was observed in the epithelial cells of the intestine and hepatopancreas. It is very likely that in *N. davidi*, BPA induced different oxidants production, leading to a rapid increase in GSH levels in cells of both organs after 24 h of experiment. However, it is important to conduct further research not only on the activation of oxidants but also on the antioxidant enzymes that are activated during oxidative stress.

5. Conclusions

The present findings demonstrate that BPA disrupts multiple cytotoxicity pathways, including damage to organelles, nuclei, and DNA, and eventually triggers a cascade of cellular interactions. Collectively, these effects result in pronounced degenerative changes in the cells of animals exposed to BPA-contaminated water. We conclude that the oxidant-antioxidant imbalance induced by BPA compromises epithelial cell homeostasis, leading to midgut barrier dysfunction and impairing the regenerative capacity of the digestive system.

Acknowledgments

We thank Dr Danuta Urbańska-Jasik, MSc Szymon Jędruszek, and MSc Adrian Maślowski (University of Silesia in Katowice, Poland) for their technical assistance and Richard Ashcroft (<http://www.anglopolonia.com/home.html>) for language correction. The article was co-funded by the project: “JUŚt transition – Potencjał Uniwersytetu Śląskiego podstawą Sprawiedliwej Transformacji regionu” (FESL.10.25-IZ.01.0369/23-003). The project is implemented under the European Funds for Silesia 2021-2027. Program co-financed by the Just Transition Fund.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

ORCID

S. Student  <http://orcid.org/0000-0003-1812-5496>

M. Rost-Roszkowska  <http://orcid.org/0000-0001-7124-8423>

Data availability statement

All raw data used in this publication are held in Professor Rost-Roszkowska repository and will be available upon request.

References

Abd Elkader HAE, As A-S. 2023. Chronic exposure to bisphenol a induces behavioural, neurochemical, histological, and ultrastructural alterations in the ganglia tissue of the date mussels lithophaga lithophaga. Environmental Science and Pollution Research 30(50):109041–109062. DOI: [10.1007/s11356-023-29853-3](https://doi.org/10.1007/s11356-023-29853-3).

- Abidi O, Khazri A, Belgacem R, García-Barrera T, Mahmoudi E, Dellali M. 2026. Effects of bisphenol a on freshwater mussels: Insights into the protective mechanisms of selenium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 24:110362. DOI: [10.1016/j.cbpc.2025.110362](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2025.110362).
- Beatty BJ, Mackie RS, Mattingly KS, Carlson JO, Rayms-Keller A. 2002. The midgut epithelium of aquatic arthropods: A critical target organ in environmental toxicology. *Environmental Health Perspectives* 110(suppl 6):911–914. DOI: [10.1289/ehp.02110s6911](https://doi.org/10.1289/ehp.02110s6911).
- Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. 2021. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death. *Cellular and Molecular Immunology* 18(5):1106–1121. DOI: [10.1038/s41423-020-00630-3](https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3).
- Björnsdotter MK, de Boer J, Ballesteros-Gómez A. 2017. Bisphenol a and replacements in thermal paper: A review. *Chemosphere* 182:691–706. 2017.05.070. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2017.05.070](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.070).
- Brigelius-Flohé R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 27(9–10):951–965. DOI: [10.1016/s0891-5849\(99\)00173-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00173-2).
- Candas D, Li JJ. 2014. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid Redox Signal* 1 20(10):1599–1617. DOI: [10.1089/ars.2013.5305](https://doi.org/10.1089/ars.2013.5305).
- Canesi L, Betti M, Lorusso LC, Ciacci C, Gallo G. 2005. 'In vivo' effects of bisphenol a in mytilus hemocytes: Modulation of kinase-mediated signalling pathways. *Aquatic Toxicology* 71(1):73–84. DOI: [10.1016/j.aquatox.2004.10.011](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.10.011).
- Canesi L, Fabbri E. 2015. Environmental effects of BPA: Focus on aquatic species. Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society 13(3):1559325815598304. DOI: [10.1177/1559325815598304](https://doi.org/10.1177/1559325815598304).
- Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi AM. 2009. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9(6):377–384. DOI: [10.1016/j.mito.2009.08.009](https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.08.009).
- Careghini A, Mastorgio AF, Saponaro S, Sezenna E. 2015. Bisphenol a, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: A review. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (8):5711–5741. DOI: [10.1007/s11356-014-3974-5](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3974-5).
- Castritsi-Catharios J, Syriou V, Miliou H, Zouganelis GD. 2013. Toxic effects of bisphenol a to the nauplii of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Journal of Biological Research- Thessaloniki* 19:38–45.
- Chajec L, Rost-Roszkowska MM, Vilimova J, Sosinka A. 2012. Ultrastructure and regeneration of midgut epithelial cells in *Lithobius forficatus* (chilopoda, lithobiidae). *Invertebr Biol* 131:119–132. DOI: [10.1111/j.1744-7410.2012.00264.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2012.00264.x).
- Chandimali N, Bak SG, Park EH, Lim HJ, Won YS, Kim EK, Park SI, Lee SJ. 2025. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: A review. *Cell Death Discovery* 11(1):19. DOI: [10.1038/s41420-024-02278-8](https://doi.org/10.1038/s41420-024-02278-8).
- Chang C-J, Lee S-Y. 2024. Mitochondrial glutathione in cellular redox homeostasis and disease manifestation. *Int. J. Mol. Sci* 25:1314. DOI: [10.3390/ijms25021314](https://doi.org/10.3390/ijms25021314).
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61(2):192–208. DOI: [10.1007/s00018-003-3206-5](https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5).
- Chen Z, Wang F, Wen D, Mu R. 2022. Exposure to bisphenol a induced oxidative stress, cell death and impaired epithelial homeostasis in the adult *Drosophila melanogaster* midgut. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 15(248):114285. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2022.114285](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114285).
- Coluzzi E, Colamartino M, Cozzi R, Leone S, Meneghini C, O'Callaghan N, Sgura A. 2014. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PloS one* 9(10):e110963. DOI: [10.1371/journal.pone.0110963](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110963).
- Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. 2009. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reproductive Biomedicine Online* 18(6):864–880. DOI: [10.1016/s1472-6483\(10\)60038-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60038-7).
- Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed C, Williams ES, Brooks BW. 2015. Global assessment of bisphenol a in the environment: Review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society 13(3):1559325815598308. DOI: [10.1177/1559325815598308](https://doi.org/10.1177/1559325815598308).
- Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, Guillette Jr. LJ. 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology* 24(2):225–239. DOI: [10.1016/j.reprotox.2007.05.008](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.008).
- Dawood AS, Abaas HK. 2022. Histopathological study of the effect of glutathione in decreasing pathological changes induced by estrogen in internal organs of albino mice. *International Journal of Health Sciences* 6(55):1019–1034. DOI: [10.53730/ijhs.v6n55.8805](https://doi.org/10.53730/ijhs.v6n55.8805).
- Di Pietro P, D'Auria R, Viggiano A, Ciaglia E, Meccariello R, Russo RD, Puca AA, Vecchione C, Nori SL, Santoro A. 2020. Bisphenol a induces DNA damage in cells exerting immune surveillance functions at peripheral and central level. *Chemosphere* 254:126819. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2020.126819](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126819).
- Fabbri R, Montagna M, Balbi T, Raffo E, Palumbo F, Canesi L. 2014. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 99:1–8. DOI: [10.1016/j.marenvres.2014.05.007](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.05.007).
- Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Mari M, Miranda M, Ardite E. 2005. Oxidative stress: Role of mitochondria and protection by glutathione. *BioFactors* 25(1–4):1–13. DOI: [10.1002/biof.5520080102](https://doi.org/10.1002/biof.5520080102).
- Franco R, Cidlowski JA. 2009. Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant. *Cell Death & Differentiation* 16 (10):1303–1314. DOI: [10.1038/cdd.2009.107](https://doi.org/10.1038/cdd.2009.107).
- Gassman NR. 2017. Induction of oxidative stress by bisphenol a and its pleiotropic effects. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 58(2):60–71. DOI: [10.1002/em.22072](https://doi.org/10.1002/em.22072).

- Gassman NR, Wilson SH. 2017. Bisphenol A and nongenotoxic drivers of cancer. Michael Waters, Claude Hughes, editors. TT: WDSRC Chapter 12. [10.1002/9781119023647.ch12](https://doi.org/10.1002/9781119023647.ch12).
- Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A. 2020. The effects of cadmium toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(11):3782. DOI: [10.3390/ijerph17113782](https://doi.org/10.3390/ijerph17113782).
- Gerhardt A. 2019. Plastic additive bisphenol a: Toxicity in surface- and groundwater crustaceans. *Journal of Toxicology and Risk Assessment* 5(1):017. DOI: [10.23937/2572-4061.1510017](https://doi.org/10.23937/2572-4061.1510017).
- Golbidi S, Botta A, Gottfred S, Nusrat A, Laher I, Ghosh S. 2014. Glutathione administration reduces mitochondrial damage and shifts cell death from necrosis to apoptosis in ageing diabetic mice hearts during exercise. *British Journal of Pharmacology* 171(23):5345–5360. DOI: [10.1111/bph.12847](https://doi.org/10.1111/bph.12847).
- González-Olalla JM, Vila-Duplá M, Cabrerizo MJ, González-Egea I, Parra G, Medina-Sánchez JM, Carrillo P. 2024. How does increasing temperature affect the toxicity of bisphenol a on *Cryptomonas ovata* and its consumer *Daphnia magna*? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 285:117090. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2024.117090](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117090).
- Gorol H, Ostróžka A, Wilczek G, Ł C, Student S, Aleksa A, Rost-Roszkowska M. 2025. How does bisphenol a damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *European Zoological Journal* 92(1):390–409. DOI: [10.1080/24750263.2025.2463421](https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2463421).
- Gowda BKC, Kokila G. 2017. Ultrastructural changes in cell death. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 21(2):299–300. [10.4103/jomfp.JOMFP_137_17](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_137_17). PMID: 28932044; PMCID: PMC5596685.
- Gulcin İ. 2025. Antioxidants: A comprehensive review. *Archives of Toxicology* 99(5):1893–1997. DOI: [10.1007/s00204-025-03997-2](https://doi.org/10.1007/s00204-025-03997-2).
- Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D. 2013. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research* 8(21):2003–2014. DOI: [10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009).
- Jabłońska A, Mamos T, Gruszka P, Szlauer-Lukaszewska A, Grabowski M. 2018. First record and DNA barcodes of the aquarium shrimp, *Neocaridina davidi*, in Central Europe from thermally polluted River Oder canal, Poland. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 419(14):1–5. DOI: [10.1051/kmae/2018004](https://doi.org/10.1051/kmae/2018004).
- Kamogashira T, Fujimoto C, Yamasoba T. 2015. Reactive oxygen species, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in hearing loss. *BioMed Research International* 2015:617207. DOI: [10.1155/2015/617207](https://doi.org/10.1155/2015/617207).
- Karzi V, Ozcagli E, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Fragkiadoulaki I, Kalliantasi A, Chalkiadaki C, Alegakis A, Stivaktakis P, Karzi A, Makrigiannakis A, Docea AO, Calina D, Tsatsakis A. 2023. DNA damage estimation after chronic and combined exposure to endocrine disruptors: An in vivo real-life risk simulation approach. *International Journal of Molecular Sciences* 24(12):9989. DOI: [10.3390/ijms24129989](https://doi.org/10.3390/ijms24129989).
- Koizumi T, Yokota T, Shirakura H, Tatsumoto H, Suzuki KT. 1994. Potential mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: Inhibitory action of cadmium on mitochondrial respiratory activity. *Toxicology* 92(1–3):115–125. DOI: [10.1016/0300-483x\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0300-483x(94)90171-6).
- Kozlov AV, Javadov S, Sommer N. 2024. Cellular ROS and antioxidants: Physiological and pathological role. *Antioxidants (Basel)* 14 13(5):602. DOI: [10.3390/antiox13050602](https://doi.org/10.3390/antiox13050602).
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews* 87(1):99–163. DOI: [10.1152/physrev.00013.2006](https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006).
- Kvedariene V, Vaskovic M, Semyte JB. 2025. Role of oxidative stress and antioxidants in the course of atopic dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences* 26(9):4210. DOI: [10.3390/ijms26094210](https://doi.org/10.3390/ijms26094210).
- Liang J, Ch L, Dang Y, Feng X, Ji X, Liu X, Zhao X, Zhang Q, Ren Z, Wang Y, Li Y, Qu G, Liu R. 2024. Occurrence of bisphenol a analogues in the aquatic environment and their behaviors and toxicity effects in plants. *Environment International* 193:109105. DOI: [10.1016/j.envint.2024.109105](https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.109105).
- Liu J, Zhu R, Wang S, Dai X, Zou A, Jiang F, Sun S, Ou J, Zhao W. 2025. BPA disrupts crustacean reproduction: Tissue-specific accumulation, oxidative stress, and gene dysregulation in *Macrobrachium nipponense*. *Aquatic Toxicology* 287:107538. DOI: [10.1016/j.aquatox.2025.107538](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2025.107538).
- Luberda Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology* 5(1):5–17.
- Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology* 146(1):3–15. PMID: 7856735; PMCID: PMC1870771.
- Marí M, de Gregorio E, de Dios C, Roca-Agujetas V, Cucarull B, Tutusaus A, Morales A, Colell A. 2020. Mitochondrial glutathione: Recent insights and role in disease. *Antioxidants (Basel)* 9(10):909. DOI: [10.3390/antiox9100909](https://doi.org/10.3390/antiox9100909).
- Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling* 11(11):2685–2700. DOI: [10.1089/ARS.2009.2695](https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2695).
- Martin LJ. 2010. Mitochondrial and cell death mechanisms in neurodegenerative diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 3(4):839–915. DOI: [10.3390/ph3040839](https://doi.org/10.3390/ph3040839).
- Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, Abbas K, Moinuddin, Hassan MI, Habib S, Islam S. 2024. Apoptosis: A comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. *Cells* 13(22):1838. DOI: [10.3390/cells13221838](https://doi.org/10.3390/cells13221838).
- Neighmond H, Quinn A, Schmandt B, Ettinger K, Hill A, Williams L. 2023. Developmental bisphenol S toxicity in two freshwater animal models. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 104:104311. DOI: [10.1016/j.etap.2023.104311](https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104311).
- Nguyen D, Osterlund E, Kale J, Andrews DW. 2024. The C-terminal sequences of Bcl-2 family proteins mediate interactions that regulate cell death. *The Biochemical Journal* 481(14):903–922. DOI: [10.1042/BCJ20210352](https://doi.org/10.1042/BCJ20210352).

- Nunnari J, Suomalainen A. 2012. Mitochondria: In sickness and in health. *Cell* 148(6):1145–1159. DOI: [10.1016/j.cell.2012.02.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035).
- Ostróżka A, Chajec Ł, Wilczek G, Student S, Kocot K, Homa J, Rost-Roszkowska MM. 2024. Toxic effects of nickel on tolerance and regeneration in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *European Zoological Journal* 91(1):180–205. DOI: [10.1080/24750263.2024.2310041](https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2310041).
- Ostróżka A, Tiffert Z, Wilczek G, Rost-Roszkowska M. 2022. Can insecticide-free clean water regenerate the midgut epithelium of the freshwater shrimp after dimethoate treatment? *Micron* 155:103162. DOI: [10.1016/j.micron.2021.103162](https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103162).
- Ostróżka A, Wilczek G, Tarnawska M, Student S, Rost-Roszkowska M. 2025. Relationship between different toxic effects of nickel on tolerance and recovery in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *European Zoological Journal* 92(1):876–895. DOI: [10.1080/24750263.2025.2533312](https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2533312).
- Park SY, Choi J. 2009. Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol a exposure in aquatic biomonitoring species: Freshwater crustacean, *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83(4):463–468. DOI: [10.1007/s00128-009-9745-1](https://doi.org/10.1007/s00128-009-9745-1).
- Perin CI, Silva PB, da Rosa JA. 2022. Genotoxic potential of bisphenol a: A review. *Environmental Pollution* 299:119346. DOI: [10.1016/j.envpol.2022.119346](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119346).
- Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. 2015. Peroxiredoxins: Guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 40(8):435–445. DOI: [10.1016/j.tibs.2015.05.001](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.001).
- Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1644(2–3):83–94. DOI: [10.1016/j.bbamcr.2003.08.012](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.012).
- Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Wilczek G, Student S, Leśniewska M, Rost-Roszkowska MM. 2022. Ovaries and testes of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda) react differently to the presence of cadmium in the environment. *Scientific Reports* 12(1):6705. DOI: [10.1038/s41598-022-10664-4](https://doi.org/10.1038/s41598-022-10664-4).
- Qu W, Zhao Z, Chen S, Zhang L, Wu D, Chen Z. 2018. Bisphenol a suppresses proliferation and induces apoptosis in colonic epithelial cells through mitochondrial and MAPK/AKT pathways. *Life Sciences* 208:167–174. DOI: [10.1016/j.lfs.2018.07.040](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.040).
- Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. 2009. Mitochondrial functionality in reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update* 15(5):553–572. DOI: [10.1093/humupd/dmp016](https://doi.org/10.1093/humupd/dmp016).
- Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. 2014. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol* 5:151. DOI: [10.3389/fphar.2014.00151](https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00151).
- Rochester JR. 2013. Bisphenol a and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology* 42:132–155. DOI: [10.1016/j.reprotox.2013.08.008](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008).
- Rost-Roszkowska M, Machida R, Fukui M. 2010. Necrosis and apoptosis in the midgut epithelium of *Acheta domestica* (Insecta, Orthoptera, Gryllidae). *Journal of Insect Science* 10(1):1–11.
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Leśniewska M, Student S. 2020b. Effects of short- and long-term exposure to cadmium on salivary glands and fat body of soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda): Histology and ultrastructure. *Micron* 137:102915. DOI: [10.1016/j.micron.2020.102915](https://doi.org/10.1016/j.micron.2020.102915).
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Wilczek G, Skowronek M, Student S, Leśniewska M. 2022. Hazards related to the presence of cadmium in food – studies on the European soil centipede, *Lithobius forficatus*. *Science of the Total Environment* 845:157298. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.157298](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157298).
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Skowronek M, Nadgórska-Socha A, Leśniewska M. 2020a. Influence of soil contaminated with cadmium on cell death in the digestive epithelium of soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). *European Zoological Journal* 87(1):242–262. DOI: [10.1080/24750263.2020.1757168](https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1757168).
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Wilczek G, Wilczek P, Tarnawska M, Student S, Leśniewska M. 2021. Effects of cadmium on mitochondrial structure and function in different organs: Studies on the soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). *European Zoological Journal* 88(1):632–648. DOI: [10.1080/24750263.2021.1912199](https://doi.org/10.1080/24750263.2021.1912199).
- Rost-Roszkowska M, Urbisz AZ, Małota K, Wilczek G, Chajec Ł, Kocot K, Aleksa A, Dąbrowska D. 2025. Cytotoxic effects of leachate from landfill tanks: A study on the model species *Drosophila melanogaster*. *Science of the Total Environment* 992:179956. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2025.179956](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.179956).
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 9(1):49–89. DOI: [10.1089/ars.2007.9.49](https://doi.org/10.1089/ars.2007.9.49).
- Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A. 1997. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* 411(1):77–82. DOI: [10.1016/s0014-5793\(97\)00669-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00669-8).
- Schieber M, Chandel NS. 2014 May 19. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* 24(10):R453–62. DOI: [10.1016/j.cub.2014.03.034](https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034).
- Seachrist DD, Bonk KW, Ho SM, Prins GS, Soto AM, Keri RA. 2016. A review of the carcinogenic potential of bisphenol a. *Reproductive Toxicology* 59:167–182. DOI: [10.1016/j.reprotox.2015.09.006](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.09.006).

- Sies H, Belousov VV, Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, Mann GE, Murphy MP, Yamamoto M, Winterbourn C. 2022. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23(7):499–515. DOI: [10.1038/s41580-022-00456-z](https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z).
- Singh R, Letai A, Sarosiek K. 2019. Regulation of apoptosis in health and disease: The balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20(3):175–193. DOI: [10.1038/s41580-018-0089-8](https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8).
- Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. 2013. Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. 2013. *Archives of Toxicology* 87(7):1157–1180. DOI: [10.1007/s00204-013-1034-4](https://doi.org/10.1007/s00204-013-1034-4).
- Siracusa JS, Yin L, Measel E, Liang S, Yu X. 2018. Effects of bisphenol a and its analogs on reproductive health: A mini review. *Reproductive Toxicology* 79:96–123. DOI: [10.1016/j.reprotox.2018.06.005](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.005).
- Sonakowska L, Włodarczyk A, Poprawa I, Binkowski M, Śróbka J, Kamińska K, Kszuk-Jendrysik M, Chajec Ł, Zajusz B. 2015. Structure and ultrastructure of the endodermal region of the alimentary tract in the freshwater shrimp *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca). *PLoS One* 10(5):e0126900. DOI: [10.1371/journal.pone.0126900](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126900).
- Sonakowska L, Włodarczyk A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Rost-Roszkowska MM, Lebedeva IV. 2016. Cell death in the epithelia of the intestine and hepatopancreas in *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca). *PLoS One* 11(2): e0147582. DOI: [10.1371/journal.pone.0147582](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147582).
- Sonakowska-Czajka L, Śróbka J, Ostróżka A, Rost-Roszkowska MM. 2021. Postembryonic development and differentiation of the midgut in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca, decapoda) larvae. *Journal of Morphology* 282(1):48–65. DOI: [10.1002/jmor.21281](https://doi.org/10.1002/jmor.21281).
- Srinivasan S, Avadhani NG. 2012. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 53(6):1252–1263. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.021](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.021).
- Susiarjo M, Sasson I, Mesaros C, Bartolomei MS Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLOS Genet.* 2013;9(4)e1003401. DOI: [10.1371/journal.pgen.1003401](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003401).
- Tumilaar SG, Hardianto A, Dohi H, Kurnia DA. 2024. A comprehensive review of free radicals, oxidative stress, and antioxidants: Overview, clinical applications, global perspectives, future directions, and mechanisms of antioxidant activity of flavonoid compounds. *Journal of Chemistry* 2024:1–21. DOI: [10.1155/2024/5594386](https://doi.org/10.1155/2024/5594386).
- Vaux DL, Cory S, Adam JM. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335(6189):440–442. DOI: [10.1038/335440a0](https://doi.org/10.1038/335440a0).
- Vogler M, Braun Y, Smith VM, Westhoff MA, Pereira RS, Pieper NM, Anders M, Callens M, Vervliet T, Abbas M, Macip S, Schmid R, Bultynck G, Dyer MJS. 2025. The BCL2 family: From apoptosis mechanisms to new advances in targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 10(1):91. DOI: [10.1038/s41392-025-02176-0](https://doi.org/10.1038/s41392-025-02176-0).
- Wang K, Zhao Z, Ji W. 2019. Bisphenol a induces apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in colon and liver of mice in a mitochondria-dependent manner. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 117:109182. DOI: [10.1016/j.biopha.2019.109182](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109182).
- Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. 2019. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death and Disease* 10(3):177. DOI: [10.1038/s41419-019-1407-6](https://doi.org/10.1038/s41419-019-1407-6).
- Weber S, Traunspurger W. 2016. Influence of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) on freshwater meiofaunal assemblages. *Limnologia* 59:155–161. DOI: [10.1016/j.limno.2016.06.001](https://doi.org/10.1016/j.limno.2016.06.001).
- Włodarczyk A, Sonakowska L, Kamińska K, Marchewka A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Rost-Roszkowska M. 2017. The effect of starvation and re-feeding on mitochondrial potential in the midgut of *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). *PLoS One* 12(3):e0173563. DOI: [10.1371/journal.pone.0173563](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173563).
- Włodarczyk A, Student S, Rost-Roszkowska M. 2019. Autophagy and apoptosis in starved and re-fed *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) midgut. *Canadian Journal of Zoology* 97(4):294–303. DOI: [10.1139/cjz-2018-0104](https://doi.org/10.1139/cjz-2018-0104).
- Włodarczyk A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Ostróżka A, Tarnawska M, Rost-Roszkowska M. 2019. Relationship between ROS production, MnSOD activation and periods of fasting and re-feeding in freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). *PeerJ* 7:e7399. DOI: [10.7717/peerj.7399](https://doi.org/10.7717/peerj.7399).
- Xia MF, Zhang YZ, Jin K, Lu ZT, Zeng Z, Xiong W. 2019. Communication between mitochondria and other organelles: A brand-new perspective on mitochondria in cancer. *Cell & Bioscience* 9(1):27. DOI: [10.1186/s13578-019-0289-8](https://doi.org/10.1186/s13578-019-0289-8).
- Xu X, Pang Y, Fan X. 2025. Mitochondria in oxidative stress, inflammation and aging: From mechanisms to therapeutic advances. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 10(1):190. DOI: [10.1038/s41392-025-02253-4](https://doi.org/10.1038/s41392-025-02253-4).
- Yang W, Pan F, Zhao T, Chen F, Shao W, Wang J, Wang S, Zhao Z, Liu K, Zhao S, Zhao L. 2025. Bisphenol a induces apoptosis and disrupts testosterone synthesis in TM3 cells via reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway and autophagic flux inhibition. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 289:117691. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2025.117691](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.117691).
- Yao CL, Wang AL, Wang ZY, Wang WN, Sun RY. 2007. Purification and partial characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from haemolymph of oriental river prawn *macrobrachium nipponense*. *Aquaculture* 270(1–4):559–565. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2007.04.068](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.068).
- Yapryntseva MA, Zhivotovsky B, Gogvadze V. 2024. Permeabilization of the outer mitochondrial membrane: Mechanisms and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1870(7):167317. DOI: [10.1016/j.bbadis.2024.167317](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2024.167317).

- Zeng T, Jaffar S, Xu Y, Qi Y. 2022. The intestinal immune defense system in insects. *International Journal of Molecular Sciences* 23(23):15132. DOI: [10.3390/ijms232315132](https://doi.org/10.3390/ijms232315132).
- Zhang Y, Mi K, Xue W, Wei W, Yang H. 2020. Acute BPA exposure-induced oxidative stress, depressed immune genes expression and damage of hepatopancreas in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology* 103:95–102. DOI: [10.1016/j.fsi.2020.04.032](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.032).
- Zhao W, Zheng X, Jiang F, Liu J, Wang S, Ou J. 2024. Safe concentration, unsafe effects: Impact of BPA on antioxidant function in the hepatopancreas and ovarian gene expression in oriental river prawns (*Macrobrachium nipponense*). *Aquatic Toxicology* 276:107103. DOI: [10.1016/j.aquatox.2024.107103](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.107103).
- Zhao Z, Qu W, Wang K, Chen S, Zhang L, Wu D, Chen Z. 2019. Bisphenol a inhibits mucin 2 secretion in intestinal goblet cells through mitochondrial dysfunction and oxidative stress biomed. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 111:901–908. DOI: [10.1016/j.biopha.2019.01.007](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.007).

VI OŚWIADCZENIA AUTORÓW PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Katowice, dnia 18.05.2026

Magdalena Rost-Roszkowska
Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

H. Gorol, A. Ostróżka, G. Wilczek, Ł. Chajec, S. Student, A. Aleksa & M. Rost- Roszkowska (2025). How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. The European Zoological Journal, 390–409 Vol. 92, No. 1, <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2463421>

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na przygotowaniu koncepcji badań, nadzorowaniu eksperymentu oraz badań prowadzonych przez H. Gorol, nadzorowaniu analizy danych, a także pisaniu manuskryptu i wykonaniu korekty pierwszej wersji manuskryptu.



Podpis współautora publikacji

Katowice, dnia 01.06.2026

Hanna Gorol
Imię i nazwisko kandydata

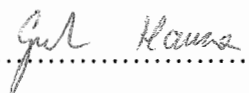
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afiliacja

OŚWIADCZENIE OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Oświadczam, że w pracy:

H. Gorol, A. Ostróżka, G. Wilczek, Ł. Chajec, S. Student, A. Aleksa & M. Rost- Roszkowska (2025). How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. The European Zoological Journal, 390–409 Vol. 92, No. 1, <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2463421>

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli ciągłej *Neocaridina davidi*, przygotowaniu materiału badawczego, przeprowadzeniu eksperymentu oraz analiz laboratoryjnych, przygotowaniu i opracowaniu tablic zawierających dokumentację badań, interpretacji wyników, zebraniu i analizie danych literaturowych oraz napisaniu oryginalnej wersji manuskryptu i jego wersji końcowej.

.....


podpis

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Anna Ostróżka

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gorol H., Ostróżka A., Wilczek G., Chajec Ł., Student S., Aleksa A., Rost-Roszkowska (2025). How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 92(1), 390-409. 1080/24750263.2025.2463421 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na pomocy w przeprowadzaniu analiz ilościowych z wykorzystaniem cytometru przepływowego MUSE.

..... Anna Ostróżka

Podpis współautora publikacji

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Grażyna Wilczek

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

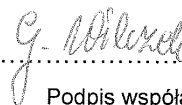
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gorol H., Ostróżka A., Wilczek G., Chajec Ł., Studnet S., Aleksa A., Rost-Roszkowska (2025). How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 92(1), 390-409. 1080/24750263.2025.2463421 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na przygotowaniu analiz statystycznych wyników badań, a także graficznym przygotowaniu wyników do publikacji.



Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Łukasz Chajec

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gorol H., Ostróżka A., Wilczek G., Chajec Ł., Student S., Aleksa A., Rost-Roszkowska (2025). How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 92(1), 390-409. 1080/24750263.2025.2463421 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na pomocy w przygotowaniu materiału biologicznego do analizy w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (krojenie skrawków ultracienkich, kontrastowanie).



Podpis współautora publikacji

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Katowice, dnia 18.05.2026

Sebastian Student
Imię i nazwisko współautora publikacji

Politechnika Śląska
Centrum Biotechnologii
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

H. Gorol, A. Ostróżka, G. Wilczek, Ł. Chajec, S. Student, A. Aleksa & M. Rost- Roszkowska (2025). How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. The European Zoological Journal, 390–409 Vol. 92, No. 1, <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2463421>

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na pomocy przy analizie obrazów z mikroskopu konfokalnego.



Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Agata Aleksa

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gorol H., Ostróżka A., Wilczek G., Chajec Ł., Student S., Aleksa A., Rost-Roszkowska (2025). How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 92(1), 390-409. 1080/24750263.2025.2463421 (autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na przygotowaniu odczynników wykorzystywanych w analizach ilościowych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, a także na pomocy w wykonywaniu tych analiz.

.....*Agata Aleksa*.....

Podpis współautora publikacji

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Katowice, dnia 18.05.2026

Magdalena Rost-Roszkowska
Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

H. Gorol, Ł. Chajec, G. Wilczek, S. Student, A. Ostróżka & M. Rost-Roszkowska. 2026. Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. THE EUROPEAN ZOOLOGICAL JOURNAL, VOL. 93, NO. 1, 563–582
<https://doi.org/10.1080/24750263.2026.2652113>

Mój udział polegał na przygotowaniu koncepcji badań, nadzorowaniu eksperymentu oraz badań prowadzonych przez H. Gorol, nadzorowaniu analizy danych, a także pisaniu manuskryptu i wykonaniu korekty pierwszej wersji manuskryptu.



Podpis współautora publikacji

Katowice, dnia 01.06.2026

Hanna Gorol
Imię i nazwisko kandydata

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afiliacja

OŚWIADCZENIE OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Oświadczam, że w pracy:

H. Gorol, Ł. Chajec, G. Wilczek, S. Student, A. Ostróżka & M. Rost-Roszkowska (2026). Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. THE EUROPEAN ZOOLOGICAL JOURNAL, VOL. 93, NO. 1, 563–582 <https://doi.org/10.1080/24750263.2026.2652113>

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli ciągłej *Neocaridina davidi*, przygotowaniu materiału badawczego, przeprowadzeniu eksperymentu oraz analiz laboratoryjnych, przygotowaniu i opracowaniu tablic zawierających dokumentację badań, interpretacji wyników, zebraniu i analizie danych literaturowych oraz napisaniu oryginalnej wersji manuskryptu i jego wersji końcowej.

.....

podpis

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Łukasz Chajec

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

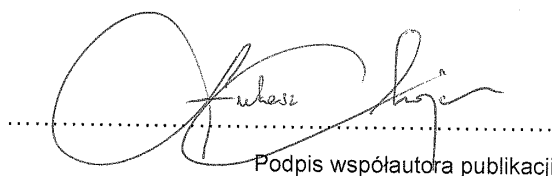
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gorol H., Chajec Ł., Wilczek G., Studnet S., Ostróżka A., Rost-Roszkowska (2026). Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 93(1), 563-582. [10.1080/24750263.2026.2652113](https://doi.org/10.1080/24750263.2026.2652113)
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na pomocy w przygotowaniu materiału biologicznego do analizy w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (krojenie skrawków ultracienkich, kontrastowanie).



Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Grażyna Wilczek

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gorol H., Chajec Ł., Wilczek G., Studnet S., Ostróżka A., Rost-Roszkowska (2026). Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 93(1), 563-582. 10.1080/24750263.2026.2652113
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na przygotowaniu analiz statystycznych wyników badań, a także graficznym przygotowaniu wyników do publikacji.



Podpis współautora publikacji

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Katowice, dnia 21.05.2026

Sebastian Student
Imię i nazwisko współautora publikacji

Politechnika Śląska
Centrum Biotechnologii
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

H. Gorol, Ł. Chajec, G. Wilczek, S. Student, A. Ostróżka & M. Rost-Roszkowska. 2026. Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. THE EUROPEAN ZOOLOGICAL JOURNAL, VOL. 93, NO. 1, 563–582
<https://doi.org/10.1080/24750263.2026.2652113>

Mój udział polegał na pomocy przy analizie obrazów z mikroskopu konfokalnego.



.....
Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Anna Ostróżka

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gorol H., Chajec Ł., Wilczek G., Studnet S., Ostróżka A., Rost-Roszkowska (2026). Bisphenol A disrupts epithelial homeostasis in the midgut of the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *The European Zoological Journal*, 93(1), 563-582. [10.1080/24750263.2026.2652113](https://doi.org/10.1080/24750263.2026.2652113)
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na pomocy w prowadzeniu hodowli *Neocaridina davidi* w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska US, a także przygotowaniu odczynników do analiz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

.....
Anne Ostróżka

Podpis współautora publikacji

VI DODATKOWE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

- Grant Rektora UŚ dla najlepszych studentów otrzymany w 2019 roku.
- Organizacja i prowadzenie warsztatów podczas Ogólnopolskiej Nocy Biologów organizowanej przez Uniwersytet Śląski w Katowicach w latach 2022-2024.
- Czynny udział w Śląskim Festiwalu Nauki w 2021 roku.
- Popularyzacja nauki poprzez prowadzenie warsztatów mikroskopowych i terenowych dla dzieci i młodzieży w ramach Projektu Warsztaty Edukacji Przyrodniczej i Ekologicznej SOB realizowane w latach 2019-2020.
- **Gorol H.**, Krodkiewska M., Gorgoń S., Cebulska K., Rost-Roszkowska M. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in some invasive polychaetes (Annelida, Polychaeta). Seeing is Believing Imaging the Molecular Process of Life, 9-12.10.2019, Heidelberg, Niemcy. Poster naukowy.
- **Gorol H.**, Rost-Roszkowska M., Wilczek G., Chajec Ł. Does bisphenol A affect the cell cycle and midgut stem cells in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca)? XXXV Konferencja Embriologiczna, 20-23.05.2024, Katowice. Poster naukowy.
- **Gorol H.**, Rost-Roszkowska M., Wilczek G., Chajec Ł., Ostróżka A. Effect of bisphenol A on regeneration of intestine and hepatopancreas epithelium in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. Visegrád Group Society for Developmental Biology Meeting 2025, 5-7.09.2025, Stará Lesná, Słowacja. Poster naukowy.
- Staż zagraniczny realizowany pod opieką dr Richarda Galajdy, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, 19-23.05.2025.
- Uczestnictwo w warsztatach Kitazato Vitrication Workshop, 23.05.2023, Walencja, Hiszpania.
- Uczestnictwo w indywidualnym kursie Ovarian Tissue Cryopreservation, 27-28.10.2025, Barcelona, Hiszpania.
- Uczestnictwo w warsztatach Kitazato Ultra Fast Protocols Workshop, 25.11.2025, Warszawa.
- Członek Europejskiego Towarzystwa European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE).
- Członek Zespołu ds. Leczenia Zaburzeń Rozwoju Płci przy Górnośląskim Centrum Zdrowia Dziecka Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.
- Udział w tworzeniu Projektu "Markery kliniczne, biochemiczne i molekularne funkcji tkanki gonadalnej/jajnikowej u dziewcząt i młodych kobiet zagrożonych hipogonadyzmem." (Projekt złożony do konkursu ABM - w oczekiwaniu na rozstrzygnięcie).