



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mileny Jankowskiej

pt.: *Mentol, składnik olejków eterycznych, czynnikiem podnoszącym efektywność bendiokarbu, insektycydu z grupy karbaminianów*

Promotor: prof. dr hab. Maria Stankiewicz

Promotor pomocniczy: dr Joanna Wyszowska

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Dziekana Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu prof. Wenera Ulricha z dnia 27 grudnia 2019 r dotyczące przygotowania oceny wspomnianej wyżej rozprawy doktorskiej.

Mgr Milena Jankowska przedstawiła rozprawę doktorską zatytułowaną „*Mentol, składnik olejków eterycznych, czynnikiem podnoszącym efektywność bendiokarbu, insektycydu z grupy karbaminianów*” w formie spójnego cyklu trzech artykułów naukowych o następujących tytułach:

A1/ Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System - A Review.

Jankowska M., Rogalska J., Wyszowska J., Stankiewicz M. *Molecules*, 2018, 23, 34

IF = 3,06; punkty_{MNiSW} = 100

A2/ The Unusual Action of Essential Oil Component, Menthol, in Potentiating the Effect of the Carbamate Insecticide, Bendiocarb. Jankowska M, Lapied B, Jankowski W, Stankiewicz M. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2019, 158,101-111

IF = 2,87; punkty_{MNiSW} = 100

A3/ Menthol Increases Bendiocarb Efficacy Through Activation of Octopamine Receptors and Protein Kinase A. Jankowska M, Wiśniewska J, Fałtynowicz Ł, Lapied B, Stankiewicz M. *Molecules*, 2019, 24, 3775

IF = 3,06; punkty_{MNiSW} = 100

Sumaryczny IF wymienionych prac wynosi 8,99, zaś łączna liczba prawidłowo policzonych punktów MNiSW wynosi 230 a nie, jak podała Doktorantka w pracy, 300 punktów. Zwyczajowo przy każdej z prac podawana jest punktacja MNiSW obowiązująca w roku opublikowania manuskryptu, zatem

właściwa liczba punktów MNiSW za artykuł przeglądowy opublikowany w 2018 roku wynosi 30, a nie 100 punktów. Wymienione powyżej artykuły uzupełnione zostały o wprowadzenie obejmujące zagadnienia związane z tematyką pracy, cele badawcze, uzasadnienie spójności tematycznej cyklu artykułów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dodatkowo do pracy dołączone zostały oświadczenia współautorów prac tworzących monotematyczny cykl publikacji. Z zawartych w rozprawie doktorskiej oświadczeń wynika, że wykład Doktorantki w przygotowaniu prac wynosił od 70% do 80%, co wskazuje na wiodącą jej rolę zarówno w przygotowaniu manuskryptów, jak i w prowadzeniu badań. Godny uwagi jest również fakt, że we wszystkich trzech pracach Pani mgr Milena Jankowska jest nie tylko pierwszym, ale także korespondencyjnym Autorem. Sądzę jednak, w żaden sposób nie podważając wiodącej roli Doktorantki w przeprowadzonych badaniach, że przy pracach wieloautorskich oszacowanie wkładu pracy na poziomie 70-80% dla jednego z Autorów może być dla współwykonawców trochę krzywdzące.

Ocena merytoryczna pracy

Tematyka recenzowanej pracy oscyluje wokół zagadnień związanych z poszukiwaniem rozwiązań pozwalających na podniesienie skuteczności działania dostępnych już na rynku insektycydów, w szczególności bendiokarbu (środka owadobójczego z grupy karbaminianów). Liczne dane statystyczne i literaturowe jednoznacznie wskazują, że liczba owadów niszczących uprawy rolne, ekosystemy leśne, a także przenoszących groźne choroby (tj. malaria, denga, zika, gorączka Zachodniego Nilu) systematycznie rośnie. Co więcej, skuteczność dostępnych na rynku preparatów owadobójczych, na skutek wytworzenia przez owady oporności, drastycznie spada. W związku z powyższym poruszana w pracy problematyka jest bardzo interesująca i niezwykle aktualna. Obecnie jednym z trendów badawczych, mających na celu poszukiwanie rozwiązań sprzyjających ograniczeniu liczebności owadów szkodników, jest opracowanie nowych metod produkcji związków owadobójczych (na bazie już istniejących) wykazujących zwiększoną skuteczność działania przy jednoczesnym ograniczeniu ich negatywnego wpływu na środowisko. W świetle najnowszych danych związkami, które mogłyby zwiększyć efektywność działania istniejących już preparatów owadobójczych są między innymi olejki eteryczne (ang. *essential oils* – EOs).

W pierwszej z prac stanowiących rozprawę doktorską [**praca przeglądowa A1**] Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat działania EOs na układ nerwowy owadów oraz opisała główne mechanizmy ich neurotoksyczności. W przypadku owadów neurotoksyczne właściwości EOs wynikają z możliwości blokowania przez nie aktywności acetylocholinoesterazy (enzymu biorącego udział w rozkładzie acetylocholiny, jednego z głównych neuroprzekazników występujących w układzie

nerwowym zarówno bezkręgowców jak i kręgowców) oraz ich oddziaływania na receptory GABAergiczne oraz oktopaminowe. Z zawartych w pracy przeglądowej danych wynika, że EOs nie tylko prowadzą do porażenia funkcji ruchowych owadów, ale nawet ich śmierci. Zatem związki te mogą potencjalnie stanowić nową grupę środków owadobójczych zaliczanych do tzw. bioinsektycydów.

Nadrzędnym celem badawczym recenzowanej pracy doktorskiej było sprawdzenie czy mentol, składnik EOs, zwiększa skuteczność działania jednego z najpowszechniej stosowanych środków owadobójczych – bendiokarbu [praca A2]. Pomimo tego, że w ostatnim czasie preparaty zawierające w swoim składzie bendiokarb zostały wycofane z użycia w Stanach Zjednoczonych, w wielu krajach insektycyty zawierające ten związek w dalszym ciągu stosowane są na szeroką skalę. Co więcej, środki owadobójcze opracowane na bazie bendiokarbu zalecane są wciąż przez Światową Organizację Zdrowia chociażby do zwalczania, będących wektorem malarii, komarów z rodzaju *Anopheles*. Ponadto Pani mgr Milena Jankowska, stosując właściwie dobrane metody badawcze, podjęła się próby określenia mechanizmu, który odpowiedzialny jest za zwiększenie efektywności działania bendiokarbu w obecności mentolu [praca A2 i A3]. Zawarte w pracach oryginalnych badania elektrofizjologiczne, toksykologiczne i biochemiczne wykonane zostały na owadach z gatunku *Periplaneta americana* (karaczan amerykański).

Opisane w pierwszej z prac oryginalnych [praca A2] wyniki badań dostarczyły dowodów na to, że bendiokarb w obecności mentolu wykazuje zwiększoną neurotoksyczność. W badaniach toksykologicznych (stosując test oceny zdolności motorycznych karaczana) wykazano, że czas potrzebny do zmiany pozycji owada ze strony grzbietowej na brzuszną, po godzinnej ekspozycji na mieszaninę bendiokarbu z mentolem, był wyraźnie dłuższy, niż po zastosowaniu samego bendiokarbu. Co więcej, w drugim z testów (teście „knockdown” oceniającym szybkość unieruchomienia owada), stwierdzono że mentol silnie wzmacnia neurotoksyczność bendiokarbu stosowanego w dawkach, które bez obecności mentolu wykazywały słabe działanie owadobójcze. W omawianej pracy przedstawione zostały także wyniki badań elektrofizjologicznych, które wstępnie wskazały na możliwy mechanizm ujawnienia się zwiększonej neurotoksyczności bendiokarbu w obecności mentolu. Na tym etapie badań prowadzone były u karaczanów zewnątrzkomórkowe rejestracje aktywności neuronów w jednej z konektów brzuszno-łancuszkowego nerwowego. Wyniki badań elektrofizjologicznych sugerują, że działanie mentolu na ośrodkowy układ nerwowy karaczanów związane jest z oddziaływaniem tego związku na receptory oktopaminowe. Dodatkowym potwierdzeniem słuszności postawionej hipotezy jest fakt, że działanie mentolu nie było obserwowane po uprzednim zastosowaniu fentolaminy (bloker receptorów oktopaminowych). Receptory oktopaminowe należą do rodziny receptorów metabotropowych sprzężonych z białkiem G, których aktywacja prowadzi do zmian aktywności zlokalizowanych wewnątrzkomórkowo układów enzymatycznych lub stanu funkcjonalnego błonowych

kanałów jonowych. U karaczanów przyłączenie odpowiedniego liganda do receptora oktopaminowego prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia oraz wzrostu cAMP.

W drugiej z prac oryginalnych [**praca A3**], wchodzących w skład monotematycznego cyklu stanowiącego rozprawę doktorską, przedstawione zostały wyniki, które stanowią uzupełnienie wcześniejszych badań mających na celu poznanie mechanizmu przyczyniającego się do podniesienia skuteczności działania bendiokarbu po zastosowaniu mentolu. W tym przypadku badania elektrofizjologiczne wykonane zostały na, zawierających liczne receptory oktopaminowe, neurosekrecyjnych neuronach DUM (ang. *dorsal unpaired median*) zlokalizowanych w ostatnim zwoju odłokowym karaczanów. Wspomniane wyżej neurony różnią się od innych komórek nerwowych karaczana tym, że przejawiają one zdolność do spontanicznego generowania potencjałów czynnościowych. Autorzy omawianej pracy wykazali, że mentol, podobnie jak oktopamina, hiperpolaryzował neurony DUM i hamował typową dla tych neuronów spontaniczną aktywność bioelektryczną. Ponadto badany składnik EOs powodował wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} w neuronach DUM. Co ciekawe, zwiększona neurotoksyczność bendiokarbu będąca wynikiem zastosowania mentolu nie była obserwowana w obecności związku o nazwie H-89 (inhibitor kinazy A), co sugeruje, że opisany wcześniej efekt działania mentolu jest wynikiem aktywacji szlaku kinazy białkowej A.

Reasumując, w wyniku prowadzonych badań, mgr Milena Jankowska wykazała, że mentol zwiększa efektywność działania bendiokarbu poprzez oddziaływanie na receptory oktopaminowe oraz aktywację szlaku sygnałowego związanego kinazą białkową A. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są nowatorskie i niezwykle cenne, bowiem mogą być punktem wyjścia do opracowania nowych, bardziej skutecznych preparatów owadobójczych bez jednoczesnego zwiększania ich negatywnego wpływu na środowisko.

Zawarte w rozprawie doktorskiej wyniki badań poddane zostały już ocenie merytorycznej podczas procesu ich publikacji, dlatego też nie mam większych uwag do zawartych w pracach oryginalnych danych eksperymentalnych. Niemniej jednak chciałabym poprosić, żeby podczas publicznej obrony Doktorantka:

- 1/ omówiła mechanizm rozwoju oporności owadów szkodników na działanie insektycydów,
- 2/ wyjaśniła w jakiej sytuacji kwas gama-aminomastłowy (GABA) główny neuroprzekaźnik hamujący występujący w ośrodkowym układzie nerwowym zarówno owadów jaki i ssaków może pełnić rolę neuroprzekaźnika pobudzającego (takie stwierdzenie zawarte zostało w pracy przeglądowej w rozdziale pt. *Essntial Oils – modifiers of GABA receptors*),
- 3/ wymieniła i omówiła inne właściwości mentolu, które pozwalają, lub też pozwoliłyby, na wykorzystanie tego związku w innych gałęziach przemysłu niż przemysł chemiczny.

Ocena formalna pracy

Treść rozprawy doktorskiej odpowiada jej tytułowi oraz sformułowanym celom badawczym. Prawidłowa analiza otrzymanych w trakcie badań wyników umożliwiła Doktorantce wysunięcie właściwych wniosków i opublikowanie ich w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Cała praca w zasadzie napisana jest w języku angielskim, który nie budzi większych zastrzeżeń. W rozprawie doktorskiej jedynym tekstem napisanym w języku polskim jest streszczenie, w którym już w pierwszym zdaniu jest błąd literowy (zamiast „*Owady szkodniki powodują strat w żywności...*” powinno być „*Owady szkodniki powodują straty w żywności...*”). Co więcej, w dalszej części streszczenia w języku polskim są również drobne niezgrabności stylistyczne, takie jak chociażby - cytata: „*Została ona [hipoteza zakładająca zwiększenie efektywności bendiokarbu przez mentol] potwierdzona na poziomie całego owada,...*”. Stwierdzenie na „*...poziomie całego owada,...*” jest w tym kontekście bardzo dużym i niezbyt fortunnym uogólnieniem. Także sformułowanie „*...nienaturalne wybuchy potencjałów czynnościowych...*”, które najprawdopodobniej jest kalką językową powstałą na skutek dokładnego tłumaczenia anglojęzycznego tekstu, w moim przekonaniu nie brzmi zbyt dobrze. Wśród innych błędów znalazło się również określenie „*...ilość porażonych owadów.*”. W tym przypadku poprawna forma powinna brzmieć „*...liczba porażonych owadów.*” Osobiście uważam, że przy rozprawie doktorskiej składającej się z cyklu anglojęzycznych artykułów bardziej pożądane byłoby wprowadzenie w języku polskim a nie, jak to przedstawiła Doktorantka w pracy, w języku angielskim. Wymienione powyżej uwagi o charakterze edytorskiemu, czy językowym absolutnie nie mają wpływu na bardzo wysoką ocenę końcową pracy.

Podsumowanie i ostateczne wnioski

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wskazuje niewątpliwie na dużą samodzielność naukową Pani mgr Mileny Jankowskiej nie tylko w prowadzeniu badań naukowych i pisaniu prac naukowych, ale także pozyskiwaniu środków finansowych na realizację zamierzonych planów badawczych (wszystkie omówione w rozprawie badania wykonane zostały w ramach grantu NCN, którego kierownikiem była Doktorantka). Chciałam podkreślić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki są niezwykle cenne i mogą być punktem wyjścia do opracowywania nowych, bardziej skutecznych środków owadobójczych, które jednocześnie nie stanowiłyby zagrożenia dla środowiska oraz zwierząt kręgowych, w tym człowieka. Podsumowując stwierdzam, że w mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr Mileny Jankowskiej spełnia wszelkie wymogi określone w stosownych przepisach Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Z związku z powyższym wnioskuję do Rady

Dyscypliny Nauk Biologicznych Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Mileny Jankowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zważywszy na nowatorskie koncepcje badawcze zawarte w pracy doktorskiej, duży potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników, formę przedstawionej rozprawy doktorskiej (3 publikacje w czasopismach o całkiem niezłym współczynniku oddziaływania - IF) oraz dodatkowy dorobek naukowy Doktorantki występuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o wyróżnienie zarówno recenzowanej rozprawy doktorskiej, jak i Doktorantki, stosowną nagrodą.

