



Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
☎ (+48-12) 664-53-73
E-mail: marain.lewandowski@uj.edu.pl

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister **Mileny JANKOWSKIEJ** pt.

"Mentol, składnik olejków eterycznych, czynnikiem podnoszącym efektywność bendiokarbu, insektycydu z grupy karbaminianów"

„Menthol, essential oils component, as a factor increasing effectiveness of bendiocarb insecticide”

Zanieczyszczenie środowiska, kryzys – katastrofa klimatyczna, a szczególnie globalne ocieplenie klimatu, to sprzyjające warunki niekontrolowanego wzrostu liczby owadów, w tym również tych, które są szkodliwe dla gospodarki, zdrowia i życia organizmów żywych, a także nas ludzi. Rozprawa doktorska Pani mgr Mileny Jankowskiej, dotyczy właśnie tego **niezwykle ważnego i „gorącego”** tematu. Doktorantka poszukuje sposobu, a dokładniej związków, poprawiających skuteczność działania istniejących i stosowanych od dawna środków owadobójczych, nie zwiększając jednak ich szkodliwego wpływu na inne elementy środowiska.

Dysertacja jest podsumowaniem 3 oryginalnych publikacji naukowych z Listy Filadelfijskiej ostatnich dwu lat, o dobrym współczynniku przebicia, w których Pani mgr Jankowska jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, **co wskazuje na Jej znaczący udział w powstaniu tych publikacji**, a co potwierdzają, dołączone oświadczenia współautorów. Wszystkie 3 prace są wynikiem realizacji projektu badawczego PRELUDIUM, finansowanego przez NCN, którego doktorantka była kierownikiem i głównym wykonawcą. Te dwa fakty są niesłychanie istotne i zdecydowanie ułatwiają recenzentowi ocenę pracy doktorskiej. **Zarówno bowiem założenia projektu, jak i publikacje, będące efektem jego realizacji, przeszły już przez sito wnikliwej oceny recenzentów, specjalistów badanego przedmiotu.**

W oparciu o wcześniej udowodnione fakty, przede wszystkim, że karbaminiany wpływają hamująco na enzym hydrolizujący ACh, szczegółowy cel pracy mgr Jankowskiej

polegał na sprawdzeniu hipotezy czy bendiokarb, insektycyd z grupy karbaminianów, zwiększa efektywność swojego działania po podaniu mentolu, będącego składnikiem olejków eterycznych, a jeśli tak, to jaki receptor bierze w tym udział oraz jaka ścieżka sygnałowa, metabotropowego mechanizmu komórkowego jest w to zaangażowana. **Tak logiczne sformułowanie celu badawczego (od ogółu do szczegółu) ma swoje odbicie w prezentowanym cyklu publikacji.**

Pierwszą jest praca przeglądowa, opublikowana w czasopiśmie *Molecules* (IF-3.06), w której autorka w oparciu o najnowszą literaturę, dokładnie i w bardzo jasny sposób opisuje specyficzne dla bezkręgowców metabotropowe receptory oktopaminowe, a także potencjalny synergistyczny i antagonistyczny wpływ składników olejków eterycznych na ich aktywność. Szczegółowo omawia udział neurotransmitera cholinergicznego i GABAergicznego w tym zjawisku. Wskazując między innymi na karwon, który w jednych badaniach hamuje aktywność AChE, a w innych nie. Autorka nie tłumaczy jednak, dlaczego działanie karwonu na enzym hydrolizujący ACh, jest tak różne? Ciekaw jestem opinii na ten temat. W opisie projekcji GABAergicznej, autorka zwraca uwagę, że w pewnych przypadkach u owadów, podobnie jak u ssaków GABA jest hamujące. Jakie przypadki ma autorka na myśli, oraz czy błonowy mechanizm pobudzającego działania GABA jest podobny, do tego u ssaków?

W drugiej pracy, opublikowanej w czasopiśmie *Pesticide Biochemistry and Physiology* (IF-2.87), mgr Jankowska stosując różne testy toksycznego oddziaływania badanego insektycydu, **po raz pierwszy bada wpływ mentolu na jego końcowy efekt.** Poprzez rejestrację czasu powrotu karaczana z pozycji grzbietowej na brzuszną ocenia wpływ bendiokarbu i mentolu na aktywność motoryczną owada, a w teście „knock-down”, paralizujący wpływ tych związków. Przeprowadzone testy jednoznacznie wykazały, torujące działanie mentolu na bendiokarb. Zarówno czas powrotu badanych karaczanów do pozycji „wyjściowej”, jak i ich sparaliżowana liczba, odpowiednio wydłużał się i wzrastała po podaniu mentolu razem z bendiokarbem. Logiczną konsekwencją wyników otrzymanych w testach behawioralnych, była zewnątrzkomórkowa elektrofizjologiczna rejestracja aktywności spontanicznej i odpowiedzi na bodziec mechaniczny brzusznej łańcuszka nerwowego karaczana, biorącego udział w jego aktywności motorycznej. Tu również sam bendiokarb nie wpływał istotnie na obniżenie amplitudy odpowiedzi po mechanostymulacji, natomiast podany razem z mentolem istotnie statystycznie ją obniżał, co dowodzi iż

blokował reakcję ucieczki po zastosowaniu insektycydu. Ciekawą obserwacją tego etapu badań, było spostrzeżenie, iż niższe stężenie mentolu, zarówno w testach behawioralnych, jak i elektrofizjologicznych było zdecydowanie efektywniejsze, niż wyższe, co autorka i słusznie tłumaczy wzrostem unieczynnienia receptorów cholinergicznym przy wyższym stężeniu mentolu. Efekty elektrofizjologiczne, obserwowane po podaniu mentolu, porównywalne były z aktywacją klasycznych owadzych receptorów oktopaminowych, których udział mgr Jankowska po raz pierwszy potwierdziła w kolejnej serii pomiarów. Ich zablokowanie znosiło torujący wpływ mentolu na działanie bendiokrabu, podobnie jak wcześniejsza ich aktywacja agonistą, oktopaminą.

Podsumowaniem logicznie zaplanowanych badań, jest publikacja trzecia, także w czasopiśmie *Molecules* (IF-3.06), w której autorka opisuje komórkowy mechanizmu metabotropowej transdukcji sygnału, będącej efektem aktywacji receptorów oktopaminowych. Modelem badawczym jest powszechnie stosowany w tego typu pomiarach preparat *in situ* neurosekrecyjnych neuronów DUM. Autorka wykazuje progową, charakterystyczną dla obwodowych połączeń nerwowo-mięśniowych, hyperpolaryzacje spontanicznej aktywności badanych neuronów. **Wprawdzie nie tłumaczy dużych różnic w czasie trwania i wielkości rejestrowanej hyperpolaryzacji w poszczególnych pomiarach**, to jednak stosuje adekwatną metodę pozwalającą uśrednić te różnice. Potwierdza także udział w tym hamowaniu receptorów oktopaminowych i PKA, której zablokowanie znosiło zarówno hamujący efekt mentolu, jak i wysoki poziom wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , rejestrowany po podaniu mentolu. Jony wapnia są zatem kluczowym elementem, jak określa sama autorka, w końcowym efekcie hamującym, który w oparciu w wcześniejsze parce, także te wykonane w macierzystej pracowni, sugeruje udział mLVA Na^+/Ca^{2+} prądów błonowych, zredukowanych przez aktywny receptor oktopaminowy. **Czy rzeczywiście jest to ciągle jeszcze sugestia, udziału tych prądów w obserwowanym torującym działaniu mentolu na bendiokrab, jak pisze autorka w publikacji? Jeśli tak, to co jeszcze należałoby zrobić, aby z tego trybu przypuszczającego przejść w oznajmujący?**

Wszystkie badania doktorantka przeprowadziła na karaczanach *Periplaneta americana*, choć w pracach nie znalazłem liczby użytych owadów, a także procentowego „sukcesu badawczego” w stosunku do ogólnej liczby zwierząt. Na podkreślenie jednak, zasługuje szeroki aparat stosowanych metod badawczych, które nie budzą żadnych

zastrzeżeń, od behawioru, poprzez rejestracje elektrofizjologiczne, mikroskopie konfokalną obrazowania wapniowego do analiz biochemicznych. **Opanowanie tak szerokiego warsztatu badawczego dowodzi dobrego, nie tylko merytorycznego, ale także metodycznego przygotowania do realizacji postawionych celów badawczych.**

W podsumowaniu chciałbym wyraźnie i z pełną satysfakcją podkreślić, że Pani mgr Milena Jankowska wynikami swojej pracy doktorskiej, osiągnęła zamierzone cele. W sposób precyzyjny w logicznie zaplanowanych, konsekwentnie i jasno przeprowadzonych badaniach, wykazała torujący wpływ mentolu, składnika olejków eterycznych na działanie bendiokarbu, poprzez jego wpływ na wzmocnienie hamowania AChE. Wynikami swojej pracy nie tylko uzupełniła istniejącą wiedzę na temat działania środków owadobójczych, ale wniosła jako pierwsza, zupełnie nowe wartości do mechanizmu komórkowego tej wzajemnej synergistycznej interakcji, aktywatora receptora metabotropowego i stosowanego insektycydu pokazując, które elementy badanej ścieżki transdukcji sygnału, od receptora do efektor, biorą w tym udział.

Uważam zatem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Mileny JANKOWSKIEJ do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę dużą wartość merytoryczną otrzymanych wyników, ich potencjalną możliwość aplikacyjną, a także trudność i różnorodność metodyczną, połączoną z precyzją ich wykonania oraz fakt, że badania te były realizowane w ramach autorskiego projektu PRELUDIUM NCN, a także że wyniki zostały już opublikowane w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach z list JCR, uważam, że praca doktorska Pani mgr Joanny JANKOWSKIEJ zasługuje na wyróżnienie, o co wnioskuję.

Kraków dnia 20. styczeń 2020.

Prof. dr hab. Marian H. Lewandowski