



UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką

Dr hab. n farm. Marta Kruk-Słomka, profesor Uczelni

ul. Chodźki 4A (Collegium Pharmaceuticum), 20-093 Lublin

tel. (081) 448 7250

Lublin, dnia 3 marca 2026 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Klaudii Misiołek pt. „*Reward sensitivity, social motivation and endogenous opioid signaling in adolescent C57BL/6 mice*” na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne wykonanej w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Pana Prof. dr. hab. Jana Rodriguez Parkitna.

### Podstawa wykonania recenzji:

Podstawą wykonania recenzji było pismo Dyrektora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, Pani Prof. Katarzyny Starowicz-Bubak z dnia 23 grudnia 2025 roku.

### Uzasadnienie podjęcia tematu:

Zachowania społeczne stanowią zasadniczy czynnik motywujący u ssaków oraz pełnią kluczowe funkcje adaptacyjne wpływając na efektywność, umożliwiając pozyskiwanie pożywienia czy unikanie zagrożeń i osiągnięcie sukcesu reprodukcyjnego. U ssaków, w tym u gryzoni, interakcje społeczne wykazują właściwości bodźca nagradzającego, co znajduje odzwierciedlenie w aktywacji różnych układów neuronalnych odpowiedzialnych za procesy nagrody, uczenie się oraz regulację reakcji stresowych. Wartość motywacyjna kontaktów społecznych podlega istotnym, rozwojowo uwarunkowanym zmianom, szczególnie w okresie adolescencji, związanej z intensywnymi zmianami strukturalnymi i funkcjonalnymi w ośrodkowym układzie nerwowym.

Dane literaturowe zajmujące się tym tematem podkreślają, że właśnie adolescencja jest krytycznym okresem dojrzewania układów neuronalnych zaangażowanych w procesy nagradzania, w tym układu dopaminergicznego, opioidowego i endokannabinoidowego, przy jednoczesnej

niedojrzałości układów kontroli poznawczej i regulacji emocji. Zmiany te prowadzą do przejściowego wzrostu wrażliwości na bodźce nagradzające, w tym bodźce społeczne, co sprzyja eksploracji środowiska społecznego, ale jednocześnie zwiększa podatność na zaburzenia neuropsychiatryczne.

Pomimo rosnącego zainteresowania neurobiologią zachowań społecznych, wciąż brakuje danych naukowych dotyczących tego, w jaki sposób wartość nagradzająca interakcji społecznych zmienia się na różnych etapach adolescencji, zwłaszcza w kontekście niereprodukcyjnym. Większość dotychczasowych badań koncentrowała się na dorosłych osobnikach lub na zachowaniach związanych bezpośrednio z reprodukcją, pomijając dynamiczne zmiany rozwojowe zachodzące przed osiągnięciem pełnej dojrzałości płciowej. Dodatkowo, zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw dojrzewania nagrody społecznej ma istotne znaczenie dla wyjaśnienia patofizjologii zaburzeń neurorozwojowych i psychiatrycznych, takich jak depresja, zaburzenia lękowe czy zaburzenia ze spektrum autyzmu, w których obserwuje się deficyty w przetwarzaniu bodźców społecznych.

Dane literaturowe wskazują, że endogenna sygnalizacja opioidowa odgrywa kluczową rolę w motywacyjnej wartości interakcji społecznych. Aktywacja receptorów opioidowych, wiąże się z odczuwaniem przyjemności, redukcją stresu oraz wzmocnieniem więzi społecznych, natomiast zaburzenia tej sygnalizacji prowadzą do deficytów w zachowaniach afiliacyjnych i nasilonej reakcji na stres. Zagadnienia dotyczące właśnie roli układu opioidowego w rozwoju nagradzających właściwości interakcji społecznych w kontekście niereprodukcyjnym stanowią przedmiot rozprawy doktorskiej Pani mgr Klaudii Misiołek. Tym samym prezentowane badania na poziomie behawioralnym, genetycznym i molekularnym wpisują się w aktualne kierunki badań neurobehawioralnych.

### **Ocena formalna i merytoryczna pracy:**

Praca napisana jest w języku angielskim. Całość pracy przedstawionej do oceny stanowi 141 stron, oprawionego, dwustronnego wydruku komputerowego, formatu A5. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska ma charakter hybrydowy: wyniki badań przedstawione są dwójako: te, które na etapie składania rozprawy nie zostały jeszcze opublikowane oraz te, które zostały już opublikowane jako prace oryginalne w czasopismach o międzynarodowym zasięgu. Taki charakter pracy jest zgodny z wymogami i podkreśla ważność umiędzynarodowienia dorobku naukowego oraz publikowania wyników badań w wysoko impaktowanych czasopismach naukowych.

W pracy przedstawionej do oceny można odnaleźć klasyczny układ, na który składają się:

- Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.
- Spis treści
- Wykaz skrótów użytych w rozprawie doktorskiej
- Streszczenie w języku polskim i angielskim
- Wstęp
- Cel pracy
- Prezentacja wyników, które nie zostały opublikowane z uwzględnieniem materiałów badawczych i metodyki
- Dyskusja z uwzględnieniem ograniczeń badań oraz kierunków dalszych badań i konkluzji
- Bibliografia

Powyższa część pracy licząca 89 stron, poprzedzona streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem 2 publikacji Autorki będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej, spisem treści oraz wykazem skrótów, składa się z 16-stronicowego wstępu z 1 poczwórną ryciną, 1-stronicowego celu pracy, 38-stronicowego opisu metod badawczych i statystycznych zastosowanych w pracy z 6 tabelami oraz opisowej części uzyskanych wyników zilustrowanych 12 wielocłonowymi wykresami. W dalszej części, omówieniu wyników badań (dyskusji) Autorka poświęciła 16 stron pracy z 2 rycinami włączając w ten rozdział ograniczenia badań, kierunki dalszego rozwoju oraz konkluzje. Zwieńczeniem tej części jest bogaty wykaz, nieponumerowanego, cytowanego piśmiennictwa, ułożonego alfabetycznie. Wszystkie pozycje piśmiennictwa to publikacje anglojęzyczne, większość pochodzi z ostatnich dwudziestu lat, w tym kilka pozycji zostało wydane w 2025 roku.

Dodatkowo, w dalszej części pracy ze względu na jej hybrydowy charakter uwzględniono:

- Deklaracje współautorów publikacji przedstawionych do oceny w postępowaniu doktorskim
- Dwie oryginalne publikacje naukowe napisane w języku angielskim będące częścią rozprawy doktorskiej.

Ta część pracy liczy 51 stron, z czego deklaracje współautorów zajmują 11 stron, a na pozostałych 40 stronach jest przedruk dwóch oryginalnych publikacji naukowych Doktorantki.

Powyższe dwie oryginalne prace naukowe opublikowane zostały w latach 2023 i 2025 w wysoko impaktowanych czasopismach o charakterze międzynarodowym: *Frontiers* i *Scientific Reports*. Deklarowany wkład autorski Doktorantki (potwierdzony odpowiednimi oświadczeniami innych współautorów) w powstawanie powyższych publikacji jest wiodący i polegał na stworzeniu ogólnej koncepcji badań, wykonaniu części doświadczalnej, analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. W obu pracach będących częścią rozprawy doktorskiej Pani mgr Klaudia Misiołek jest pierwszym autorem.

Struktura pracy nie budzi zastrzeżeń, uwzględniając formę hybrydową. Praca została napisana bardzo starannie i przejrzysto graficznie. Strona graficzna jest wyjątkowo dobrze dopracowana – liczne ilustracje, tabele, zdjęcia, wykresy na bardzo wysokim poziomie zdecydowanie zwiększają klarowność i czytelność pracy i ułatwiają zrozumienie kolejnych zagadnień. Sugerowałabym jedynie dodanie wykazu tabel i wykazu wykresów (na początku lub na końcu rozprawy doktorskiej), co zdecydowanie jeszcze bardziej ułatwiłoby czytanie pracy.

Rozprawa doktorska przedłożona do recenzji została logicznie uporządkowana, a jej części – zarówno opublikowane, jak i nieopublikowane wyniki badań tworzą spójny tematycznie i metodologicznie zbiór skoncentrowany wokół jasno postawionego celu. Zakres badań podjętych przez Autorkę dotyczących zachowań społecznych i ich modyfikacji ma istotne znaczenie zarówno kliniczne, jak i naukowe.

Doktorantka postawiła sobie następujący cel:

1. Ocena dynamiki nagradzających kontaktów społecznych w kontekście niereprodukcyjnym u myszy szczepu C57BL/6 na kolejnych etapach adolescencji: wczesnym (inicjacja dojrzewania), środkowym (okres dojrzewania) oraz późnym (osiągnięta dojrzałość płciowa).
2. Identyfikacja mechanizmów leżących u podstaw obserwowanych zmian behawioralnych oraz analiza zależnych od wieku zmian w endogennym układzie opioidowym na poziomie genetycznym i biochemicznym.

W pierwszym etapie badań Doktorantka analizowała na poziomie behawioralnym i molekularnym mechanizmy odpowiadające za zachowania prospołeczne, zdolność rozpoznawania stanów afektywnych oraz warunkowaną kontekstem społecznym preferencję miejsca (CPP) u dorosłych osobników. Następnie, zakładając, że adolescencja wiąże się ze zmianami w reaktywności układów nagrody, dokonano analizy porównawczej zachowań zwierząt obserwowanych w CPP

indukowanych interakcją społeczną, smacznym pokarmem oraz kokainą na różnych etapach dojrzewania (wczesnym, środkowym i późnym), w celu określenia, czy nagroda społeczna podlega swoistej trajektorii rozwojowej odrębnej od innych wzmocnień. Doktorantka skoncentrowała się na określeniu roli endogennego układu opioidowego, ze szczególnym uwzględnieniem sygnalizacji dynorfina/receptor  $\kappa$ -opiodowy (DYN/KOR), w regulacji rozwojowych zmian wartości nagradzającej interakcji społecznych w okresie adolescencji.

W celu identyfikacji mechanizmów neurobiologicznych Doktorantka dokonała oceny zależnych od wieku zmian w ekspresji genów układu opioidowego w wybranych strukturach mózgowych: w korze przedczołowej, jądrze półęzającym oraz prążkowi grzbietowym. Oznaczono poziom ekspresji genów kodujących prodynorfinę (Pdyn), proenkefalinę (Penk) oraz receptory opioidowe  $\mu$  (Oprm1),  $\delta$  (Oprd1) i  $\kappa$  (Oprk1), uzyskując kompleksową charakterystykę dojrzewania osi peptyd opioidowy–receptor. Dodatkowo, zastosowano technikę RNAscope in situ hybridization w celu precyzyjnego mapowania przestrzennego ekspresji Pdyn oraz identyfikacji populacji komórkowych wykazujących reorganizację zależną od wieku.

Na końcowym etapie Doktorantka oceniła funkcjonalne znaczenie sygnalizacji DYN/KOR w modulacji nagrody społecznej i narkotykowej w okresie adolescencji, wykorzystując procedurę CPP z farmakologiczną blokadą receptora KOR przy użyciu selektywnego antagonisty norbinaltorfimy (nor-BNI) lub genetyczną blokadą receptora KOR (konstytutywna delecja genu Pdyn).

Cel został jasno sformułowany, a jego zasadność wynika z przedstawionych we Wstępie przesłanek merytorycznych, gdzie Doktorantka opisuje podstawowe pojęcia dotyczące zachowań i interakcji społecznych, rolę układów neuronalnych regulujących nagrodę, uczenie się i stres, które dojrzewają w trakcie rozwoju, skupiając się na roli endogennych opioidów w regulacji zachowań społecznych. Cały rozdział bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę badawczą, jest logiczny i przejrzysty ułożony. Część wprowadzająca wzbogacona jest w bardzo przejrzysty schemat obrazujący zmiany plastyczności neuronalnej w okresie adolescencji oraz odpowiadające im adaptacje w układach dopaminergicznym i opioidowym. W rozdziale tym znalazł się również podrozdział dotyczący użytego w przeprowadzonych przez Doktorantkę badaniach behawioralnych testu warunkowanej preferencji miejsca (CPP). W moim czysto subiektywnym odczuciu ten właśnie podrozdział „Animal models of social reward” mógłby być przeniesiony na sam koniec rozdziału Introduction. Wprowadziłbym również we Wstępie skrót do dopamina (DA) i receptorów dopaminowych 1 i 2 (D1 i D2) – ponieważ te dwa ostatnie znajdują się na liście skrótów, a nie są wyjaśnione w tekście tylko dopiero w opisie Rysunku 1, i później należałoby konsekwentnie używać tych skrótów.

W kolejnej części rozprawy doktorantka opisała zastosowane metody i techniki badawcze. Doświadczenia behawioralne przeprowadzono na myszach szczepu C57BL/6 zgodnie z wszystkimi procedurami i wymogami Komisji Etycznej używając testu CPP, social CPP, CPP z kokainą, CPP z nor-binaltorphimina, open-field test, light-dark test, test interakcji społecznych oraz test preferencji sacharozy. W tej części w opisie podawania związków jak kokaina czy nor-binaltorphimina brak jest wyjaśnienia w czym były rozpuszczane poszczególne związki; brak jest również jasnego przedstawienia na podstawie których danych literaturowych zostały wybrane dawki do poszczególnych doświadczeń (brak stosownych cytowań). Brak również stosownych cytowań w zakresie opisu niektórych testów behawioralnych: open-field test, light-dark test, test interakcji społecznych i test preferencji sacharozy - na jakiej podstawie jest ustalona procedura doświadczalna, zakres czasowy itd.). Metody statystyczne są dobrane w sposób poprawny, jak i wielkość próby badawczej (ilość zwierząt w poszczególnych grupach badawczych). O ile w tabelach jest pokazana liczebność poszczególnych grup, to zabrakło wykazania całkowitej liczby wykorzystanych w doświadczeniach zwierząt. Brak również wskazania opisu ilu czynnikiem ANOVA była użyta do analizy statystycznej? 1,2,3,4? Oczywiście tę informację można odnaleźć w opisie niektórych wykresów, ale może warto by było zaznaczyć to też w opisie metod statystycznych.

Następnie zwierzęta poddano eutanazji poprzez dekapitację, pobrano struktury mózgowie. Doktorantka przeprowadziła analizy na poziomie behawioralnym, molekularnym i genetycznym. Zastosowano metody analizy ilościowego oznaczania poziomu kwasów nukleinowych typu qPCR i wysokoczułą metodę hybrydyzacji in situ RNAscope. Warto podkreślić, że wykorzystana przez Doktorantkę metodyka badawcza i stosowane techniki badawcze są wysoce nowoczesne, wymagają dużej znajomości neuroanatomii oraz precyzyjnej techniki eksperymentalnej, a tym samym świadczą jednocześnie o dużej samodzielności Doktorantki.

Wyniki zostały przedstawione w sposób usystematyzowany i klarowny. W opisie wyników podano dane z przeprowadzonych analiz statystycznych w sposób opisowy i/lub na rycinach i/lub tabelach. Ten rozdział jest przygotowany bardzo starannie, estetycznie i przejrzysto.

Pracę kończy obszerna dyskusja uzyskanych wyników. Dyskusja zawiera odniesienia do nowszych i/lub najnowszych prac naukowych, szczegółowo analizuje wszystkie uzyskane wyniki. Podział na kilka podrozdziałów tematycznych jest dużym ułatwieniem i zwiększa przejrzystość odbioru. Podrozdział dotyczący ograniczeń i kolejnych perspektyw badań w powyższym temacie

podkreśla jej wnikliwy charakter naukowy Doktorantki, wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki oraz zapewnia spójność koncepcji badawczej.

Na podstawie otrzymanych wyników, opublikowanych i jeszcze nieopublikowanych Doktorantka wyciągnęła następujące wnioski:

1. Dorosłe samice myszy wykazywały istotnie wyższy poziom zachowań prospołecznych niż samce, podczas gdy w zakresie nagrody społecznej w kontekście rodzeństwa oraz zdolności do rozpoznawania stanów emocjonalnych rówieśników nie stwierdzono różnic międzypłciowych. (Wyniki opublikowane w publikacji w czasopiśmie Scientific Reports).

2. W okresie adolescencji myszy charakteryzowały się obniżoną wrażliwością zarówno na nagrodę społeczną, jak i nagrodę pokarmową w porównaniu z osobnikami dorosłymi, podczas gdy wartość nagradzająca kokainy pozostawała niezmienną (Wyniki opublikowane w publikacji w czasopiśmie Frontries).

3. Mechanizmy związane z powyższymi zmianami behawioralnymi zostały ocenione na poziomie neuromolekularnym. Analizie poddano zmiany rozwojowe w ekspresji genów endogenego układu opioidowego, a także zastosowano manipulacje farmakologiczne i genetyczne w celu weryfikacji przyczynowej roli sygnalizacji opioidowej w kształtowaniu nagrody społecznej związanej z interakcjami rówieśniczymi. W adolescencji obserwuje się regionowo i komórkowo specyficzną reorganizację ekspresji Pdyn, obejmującą jej spadek w korze przedczołowej i prążkowiu grzbietowym oraz wzrost współekspresji Pdyn/Oprk1 w prążkowie i jądrze półleżącym. Wskazuje to na rozwojową modulację sygnalizacji DYN/KOR w obwodach regulujących zachowania społeczne i reakcje stresowe. W późnej adolescencji wartość interakcji społecznych może wynikać bardziej z redukcji stresu izolacyjnego niż z bezpośrednich właściwości hedonicznych. Zjawisko to prawdopodobnie odzwierciedla dojrzewanie układu DYN/KOR i rosnący wpływ mechanizmów stresowych na przetwarzanie nagrody (Wyniki nieopublikowane).

Dodatkowo warto zaznaczyć, że badania będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały wykonane w ramach 3 grantów: OPUS 11, OPUS 18, których kierownikiem był Promotor Doktorantki Pan Prof. dr hab. Jan Rodriguez-Paritna, oraz PRELUDIUM-21, którym kierownikiem był Doktorantka Pani mgr Klaudia Misiołek.

Reasumując, całość pracy oceniam bardzo pozytywnie. Pani mgr Klaudia Misiołek w rozprawie doktorskiej zastosowała właściwe i zaawansowane metody behawioralne, molekularne i genetyczne. Ilość doświadczeń, różnorodność metod badawczych jest imponująca, co świadczy o bardzo dużym przygotowaniu teoretycznym i praktycznym Pani mgr Misiołek, pozwalającym Jej na swobodne poruszanie się w powyższym obszarze doświadczeń. Doktorantka prezentuje zdecydowanie bardzo wysoką ogólną wiedzę teoretyczną, wykazuje także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, o czym świadczą dobrze zaplanowane i wykonane przez Doktorantkę doświadczenia zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej. Dodatkowo przedstawienie wyników badań w sposób hybrydowy zwiększa wartość translacyjną pracy, wynikającą z kompleksowego ujęcia badanego zagadnienia i podkreśla wysoką jakość naukową także części opublikowanej, potwierdzoną pozytywną oceną niezależnych recenzentów czasopism naukowych. Zaprezentowana spójność tematyczna i metodologiczna, wskazuje na dojrzałość naukową Autorki oraz zdolność do realizacji długofalowego programu badawczego. Powiązanie przez Doktorantkę wielu zmian behawioralnych z ich neurobiologicznym podłożem w okresie adolescencji poszerza znacznie wiedzę dotyczącą tego tematu, i wykracza poza dotychczasowe ujęcia w literaturze. Na podkreślenie w tym miejscu zasługuje potencjalny wymiar poznawczy i translacyjny uzyskanych wyników, co może stanowić podstawę dla rozwoju nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na modulację układu opioidowego w zaburzeniach funkcjonowania społecznego. Pracę oceniam więc jako wysoce innowacyjną i perspektywiczną, a otrzymane wyniki mogą zdecydowanie zostać wykorzystane przy planowaniu kolejnych badań,

Na podstawie przeprowadzonej analizy merytorycznej oraz formalnej rozprawy doktorskiej Pani mgr Klaudii Misiołek pt.: *Reward sensitivity, social motivation and endogenous opioid signaling in adolescent C57BL/6 mice* z pełnym przekonaniem uważam, że powyższa rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2024, poz. 1571 z późn. zm.). Upoważnia mnie to do przedłożenia wniosku do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Klaudii Misiołek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

**Dodatkowo biorąc pod uwagę nowatorski charakter ocenianej pracy i wysoki stopień technik badawczych na poziomie behawioralnym, molekularnym i genetycznym, a tym samym wysoki poziom merytoryczny pracy, rozległy zakres przeprowadzonych badań zwracam się z wnioskiem o WYRÓŻNIENIE ocenianej rozprawy doktorskiej.**

dr hab. n. farm. Marta Kruk-Słomka