

Warszawa, 13. 09. 2016.

dr hab. Anna Nowicka, prof. nadzw.  
Pracownia Psychofizjologii  
Zakład Neurofizjologii  
Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego, PAN

#### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Łukasza Okruszka zatytułowanej  
**'Ocena wpływu pobudzenia emocjonalnego na funkcjonowanie poznawcze chorych na schizofrenię z uwzględnieniem wskaźników neurofizjologicznych i neuropsychologicznych'**

Kwestia wzajemnych relacji pomiędzy emocjami a procesami poznawczymi budzi w ostatnich latach ogromne zainteresowanie wielu grup badawczych. Te zintensyfikowane badania zaowocowały wysypem opublikowanych prac, które dostarczyły wielu ciekawych wyników pokazujących wpływ emocji na rozmaite procesy poznawcze, zarówno w grupach osób zdrowych, jak i w różnych grupach klinicznych. Tematyka przedłożonej mi do oceny rozprawy mgr. Łukasza Okruszka wpisuje się w nurt tych badań. Wykorzystując stymulację bodźcami obrazkowymi (zdjęcia neutralne i o negatywnym zabarwieniu emocjonalnym) w trzech różnych paradygmatach doświadczalnych, mgr Okruszek podjął próbę zbadania wpływu emocji na funkcjonowanie poznawcze osób chorych na schizofrenię. W badaniach manipulowano poziomem zaangażowania uwagi typu *bottom-up* i/lub *top-down* w procesowanie bodźców emocjonalnych i neutralnych: albo były one bodźcami nie-standardowymi w procedurze *oddball* (bodźcem standardowym była czerwono-biała szachownica), albo pełniły rolę dystraktorów w badaniu pamięci operacyjnej, albo były bodźcami, które należało zgodnie z instrukcją zapamiętać lub zapomnieć w badaniu intencjonalnego zapominania. Przebadanych zostało w sumie 124 osoby; grupy osób zdrowych i osób ze schizofrenią były równoliczne. Przebadanie takiej liczby osób świadczy o dużym zaangażowaniu doktoranta i w pełni zdaje sobie sprawę z ogromu pracy, który był konieczny do przeprowadzenia takiej liczby doświadczeń. W trakcie każdego z badań

rejestrowany był sygnał EEG. Bodźcami neutralnymi i emocjonalnymi były obrazki pochodzące z *Nencki Affective Picture System* (badanie 1, 2 i 3) oraz z *International Affective Picture System* (badanie 3). Projekt doktorski jest bardzo ambitny i w pełni zasługuje na uznanie. Doktorant wykazał, że automatyczne wzbudzenie uwagi nie różnicuje – na poziomie behawioralnym i neurofizjologicznym – grupy kontrolnej i klinicznej. Wykazał również podobny wpływ dystrakcji neutralnej i emocjonalnej u osób ze schizofrenią w zadaniu odroczonego dopasowywania do wzorca; ponadto elektrofizjologiczne wskaźniki P3 i LPP były podobne w obu grupach. Różnice międzygrupowe wystąpiły dla fazy utrzymywania informacji w pamięci: modulacja negatywnej fali wolnej pod wpływem emocji negatywnych wystąpiła tylko u osób zdrowych; u osób ze schizofrenią efekt nie był obecny. Doktorant pokazał również, że intencjonalna kontrola zapamiętywania/zapominania bodźców neutralnych i negatywnych opiera się na różnych strategiach, stosowanych przez osoby kontrolne i osoby z grupy klinicznej. Doceniając wiele aspektów tej rozprawy, w tym dogłębną dyskusję uzyskanych wyników, jako recenzent chciałabym teraz poruszyć kwestie, które wzbudziły moje wątpliwości.

Przegląd literatury stanowi znaczącą część rozprawy (liczy aż 74 strony). Mgr Okruszek omawia w tym rozdziale badania emocji, uwagi, pamięci operacyjnej i długotrwałej w normie i schizofrenii. W tej części rozprawy znalazł się również krótki opis metody potencjałów wywołanych i poszczególnych fal/komponent potencjałów wywołanych. Zwraca uwagę to, że w opisie wyników niektórych badań nie jest podana informacja o kierunku różnic pomiędzy osobami zdrowymi i osobami ze schizofrenią (np. str. 65 - „meta-analiza badań z użyciem fMRI udokumentowała istotne rozbieżności w zakresie aktywacji ciała migdałowatego u pacjentów i osób zdrowych”, str. 70 – „wyniki badania wskazały na obecność istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie wczesnych potencjałów wzrokowych”).

Sformułowanie celu ogólnego projektu, pytania i hipotezy badawcze zajmują kolejne 4 strony rozprawy. W przypadku elektrofizjologicznych wskaźników funkcjonowania osób badanych, nie jest jednak sprecyzowane, dla której fali/komponenty spodziewać się można wystąpienia różnic – lub braku różnic – międzygrupowych. Brak precyzji w zakresie oczekiwanych wyników elektrofizjologicznych na poziomie formułowania konkretnych hipotez uważam za niepoprawny. Niektóre z hipotez zakładają wynik negatywny – doktorant oczekuje braku różnic pomiędzy osobami zdrowymi i osobami ze schizofrenią na poziomie neurofizjologicznym (hipoteza 1, 3b, 4). Oczywiście hipotezy te bazują na wynikach wcześniejszych badań, ale trzeba mieć świadomość, że wynik negatywny może mieć wiele źródeł, niekoniecznie świadczy o tym, że tych różnic nie ma, lecz jedynie o tym, iż różnice międzygrupowe nie osiągnęły progu istotności statystycznej. Z drugiej strony, wnioskowanie o podobieństwie danych procesów w grupie klinicznej i grupie kontrolnej powinno opierać się na wynikach uzyskiwanych innymi metodami statystycznymi, powinny być bowiem



przeprowadzone testy, które dostarczają mocnych dowodów na prawdziwość hipotezy zerowej; niemożność odrzucenia hipotezy zerowej nie oznacza bowiem zaakceptowania/przyjęcia tej hipotezy. Potwierdzenie jej możliwe jest za pomocą innej statystyki (na przykład tzw. *Bayesian statistics*; Sean R Eddy (2004). *What is Bayesian statistics? Nature Biotechnology* 22, 1177 - 1178). Interesujące i wartościowe byłoby również sprawdzenie, czy inne wskaźniki elektrofizjologiczne, takie jak analiza widma mocy, nie wykazują różnic pomiędzy osobami zdrowymi i osobami ze schizofrenią. Ponieważ pasmo alfa i beta wiązane jest z procesami uwagowymi, zaś theta – z procesami emocjonalnymi, re-analiza zgromadzonych danych w wykorzystaniem metody np. *event-related synchronization and desynchronization (ERD/S)* mogłaby dostarczyć komplementarnych informacji na temat ewentualnych zaburzeń w przetwarzaniu emocji i funkcjonowaniu poznawczym osób ze schizofrenią. Oczywiście jest to moja propozycja do ewentualnych przyszłych analiz już zgromadzonych danych.

Opis badań własnych (trzech niezależnych eksperymentów) zajmuje 64 strony. W przypadku każdego badania, w podrozdziale 'Rejestracja i analiza EEG', brakuje wyjaśnień dotyczących wyboru elektrod do analizy. Taki wybór powinien wynikać z rozkładu topograficznego aktywności w przedziale czasowym, odpowiadającym danej fali; elektrody, których lokalizacja mieści się w obrębie maksimum takiego rozkładu, powinny być następnie wzięte do analizy. Ponieważ rejestracja EEG odbywała się z wykorzystaniem 32 elektrod, stworzenie takiej mapy jest w pełni możliwe. Zgodnie z powszechnie przyjętymi zasadami w dziedzinie badań elektrofizjologicznych, prezentując wyniki badania, zarejestrowane dane należy pokazać w wymiarze zarówno czasowym, jak i przestrzennym (Picton TW et al., (2000). *Guidelines for using human event-related potentials to study cognition: Recording standards and publication criteria. Psychophysiology*, 37, 127–152). Zmiany aktywności mózgu w funkcji czasu odzwierciedlone są w zapisie potencjałów wywołanych, zaś zmiany aktywności w funkcji przestrzeni uwidocznione są w topograficznych mapach aktywności. Map takich w rozprawie nie ma. Ponadto, aby uniknąć tzw. *double-dipping problem* (Kriegeskorte N, Simmons WK, Bellgowan PSF, Baker CI. *Circular analysis in systems neuroscience – the dangers of double dipping. Nat Neurosci.*, 2009;12:535–540), czyli sytuacji, w której analizowany jest sygnał dla tych elektrod, dla których różnice pomiędzy grupami i/lub warunkami są największe, wybór elektrod powinien opierać się o topografię aktywności, uśrednioną przez grupy i warunki.

Wyjściem alternatywnym w stosunku do zaprezentowanego powyżej, jest powołanie się na poprzednie prace z tym samym paradygmatem doświadczalnym i stwierdzenie, że wybór elektrod wynika z tego, że inni badacze dla pewnego zestawu raportowali swoje wyniki i w związku z tym te właśnie elektrody będą użyte. Takiego wyjaśnienia jednak też w rozprawie nie ma. W badaniu pierwszym, analizowane były P1, N2, P3 i LPP. Z zamieszczonych rysunków potencjałów wywołanych (dla elektrod z linii środkowej) widać, że LPP jest widoczne (ładnie 'wypiętrzone') – w obu grupach – dla Fz i Cz, analizowane było jednak dla Pz, gdzie praktycznie nie jest widoczne. Ponadto okno



czasowe, wybrane do analizy amplitudy P3 (250-450 ms), nie obejmuje całej fali: w grupie osób ze schizofrenią widać jasno (Rysunek 6, panel lewy), że maksimum amplitudy P300 dla średniej z grupy wypada tuż przy górnej granicy, tj. blisko 450 ms, co wskazuje na to, że u indywidualnych pacjentów mogło nie zmieścić się w tym oknie. Poprawniejsza w tym wypadku wydaje się być analiza nie maksymalnej, lecz średniej amplitudy P3 dla większego okna czasowego. Jestem przekonana, że P3, przanalizowane tak, jak opisałam powyżej, mogłoby pokazać efekt i grupy, i emocji. W dyskusji do badania 1, mgr Okruszek pisze „Kolejnym potencjałem, dla którego w obu grupach zaobserwowano identyczną modulację amplitudy przez bodźce afektywne jest P3”. Tak jak wyjaśniałam to powyżej, mgr Okruszek nie wykazał identyczności obu miar, a jedynie nie uzyskał istotności statystycznej różnic między grupami. Sformułowanie to jest więc zbyt mocne. We wspomnianych już wcześniej *Guidelines for using human event-related potentials to study cognition* znajduje się nawet taki podrozdział, który dotyczy interpretacji braku różnic w potencjałach: *Responses That Are Not Significantly Different Should Not Be Interpreted as Though They Were the Same*. W kontekście procedury użytej w tym badaniu – *oddball* – która została stworzona jako metoda gwarantująca wywołanie P300, dyskusyjne jest również stwierdzenie, że „najistotniejszym wynikiem niniejszego badania jest zwiększona amplituda LPP, towarzysząca prezentacji bodźców negatywnych zarówno u osób zdrowych, jak i chorych na schizofrenię”. To P3 jest markerem uwagi w tym paradygmacie. W opisie użytych bodźców pojawia się informacja, że połowa bodźców miała charakter społeczny, zaś połowa – nie. Nie stanowiło to jednak czynnika w analizie danych, choć pewnie doktorant planując badanie miał taki zamiar, skoro dopilnował równoliczności obu typów bodźców.

Celem drugiego badania było ustalenie, jaki jest wpływ dystrakcji bodźcami emocjonalnymi na pamięć operacyjną w paradygmacie odroczonego dopasowania do wzorca. W opisie analizy sygnału EEG (str. 116) mgr Okruszek pisze: „Istotne artefakty ruchowe oraz mięśniowe były usuwane przez wycięcie danego fragmentu z zapisu, po czym sygnał poddawany był niezależnej analizie komponentów (*Independent Component Analysis – ICA*)”. Rodzi się w tym momencie pytanie, co działo się po wycięciu takiego segmentu, tzn. – na przykład – czy żeby nie zaburzyć czasowego przebiegu sygnału, zastępowany był on ciągiem zerowym. W przypadku tego badania wszystkie analizy potencjałów wywołanych przeprowadzone zostały dla elektrody zlokalizowanej w Pz. Nie jest wyjaśnione, dlaczego ta właśnie lokalizacja elektrody została wybrana arbitralnie spośród 64 dostępnych lokalizacji i czym uwarunkowany był wybór zastosowanych okien czasowych.

Potencjały pokazane na Rysunku 8 obejmują cały czas trwania pojedynczej próby eksperymentalnej (5500 ms). Domyślam się, że czas 0 ms to moment pojawienia się obrazka NAPS, nie jest jednak jasne, dlaczego segmentacja sygnału EEG obejmuje aż tak długie odcinki czasowe; trudno wiązać coś, co dzieje się parę sekund po ekspozycji bodźca, z zadziałaniem tego bodźca, tym bardziej że po tym pierwszym bodźcu (obrazku NAPS), pojawiają się bodźce do zapamiętania,



a następnie – bodźce do rozpoznania (potencjały dla tych bodźców pokazane są na Rysunkach 9 i 10). Ponadto w uśrednionych potencjałach dla grupy osób zdrowych i osób ze schizofrenią, pokazanych na Rysunku 8, rzuca się w oczy fala P3, która nie została poddana analizie. U osób kontrolnych są dla niej wyraźne różnice pomiędzy obrazkami negatywnymi a neutralnymi (P3 dla negatywnych > P3 dla neutralnych), podczas gdy w grupie klinicznej różnic takich nie ma. Na Rysunku 8 pojawiają się również ryciny ze słupkami ilustrującymi średnie wartości amplitud dla fali LPP i NSW, brak jest jednak na nich odchyień standardowych. Ten problem dotyczy także kolejnych wykresów słupkowych (Badanie 3, Rysunek 12 i 16), a przecież zamieszczanie takich informacji jest pewnym standardem w raportowaniu wyników.

Moje zastrzeżenia budzi też analiza statystyczna wskaźników elektrofizjologicznych (str. 118). W przypadku analizy amplitudy LPP i NWS, do analizy wariancji włączony został czynnik „typ ERP”, podczas gdy każda z wybranych składowych potencjałów wywołanych powinna być analizowana osobno. Nie spotkałam się w żadnej opublikowanej pracy z takim podejściem do analizy komponent potencjałów wywołanych, tzn. włączaniem do analizy amplitud dwóch różnych komponent. Ciekawa jestem, co doktorant chciał w ten sposób osiągnąć. Zastanawiam się również, jak wyglądałyby potencjały wywołane z inną segmentacją, a mianowicie segmentacją ze względu na odpowiedź (w tym przypadku czas 0 ms – czas udzielenia odpowiedzi). W dyskusji Badania 2, aktywność mózgu, wyrażona jako amplituda negatywnej fali wolnej NSW, wiązana jest z aktywnością sieci czołowo-ciemieniowej. Bez analizy źródeł sygnału (lub bez jednoczesnej rejestracji EEG i sygnału BOLD) takie wnioski nie jest do końca uprawomocnione.

Badanie 3 dotyczy intencjonalnego zapamiętywania i zapominania informacji neutralnych i negatywnych. Analizowane było LPP w odpowiedzi na bodziec obrazkowy, tym razem dla elektrody CPz (w poprzednim badaniu było to Pz). Odpowiedź mózgu związana z prezentacją instrukcji oceniana była za pomocą amplitudy N2 i P3 dla elektrod Fz i Pz, wyznaczanych – odpowiednio - jako minimum i maksimum w przedziałach 200-350 ms oraz 300-450 ms. Ponieważ obie komponenty następują bezpośrednio po sobie, to amplituda P3 powinna być mierzona nie jako maksimum, lecz metodą *peak-to-peak*. Ponownie do analizy statystycznej włączony został „Typ ERP”; N2 i P3 powinny być analizowane osobno. Dla fazy testowej zadania intencjonalnego zapominania/zapamiętywania brakuje informacji na temat zarówno elektrody, wybranej do analizy, jak również nie wiadomo, jaka składowa potencjałów jest analizowana, w jakim oknie czasowym. Doktorant pisze o wyższych amplitudach ERP (str. 146), nie precyzując, co, jak i gdzie było mierzone.

Inne (drobne) niedopatrzenia to – na przykład:

str. 89 – „bodźce (...) w różnych modalnościach (słowa, zdjęcia)”; oba rodzaje bodźców są modalności wzrokowej

str. 102 – Rysunek 6, brak legendy, nie wiadomo, co oznacza czerwony i czarny kolor

str. 100, 117 – na określenie segmentów zapisu EEG, używane jest słowo „epoki”; w dbałości o czystość polszczyzny lepiej byłoby jednak używać nazwy „segment”

Wymienione powyżej uwagi polemiczne i krytyczne nie powinny przesłaniać faktu, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi prezentację wartościowego materiału, zgromadzonego w wyniku przeprowadzenia 3 badań, w których uczestniczyły liczne grupy osób zdrowych i ze schizofrenią, a uzyskane wyniki korelowane były ze zmiennymi klinicznymi. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), w związku z czym wnioskuję o dopuszczenie mgr Łukasza Okruszka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anne Nowicka