Anna Katarzyna Kozak

Implikacje behawioralne i analiza zmian zachodzących w istocie białej pod wpływem lezji siatkówkowej oraz treningu wzrokowego, zbudowanego w oparciu o bodziec testowany na pacjentach z uszkodzeniami siatkówki

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Neuroplastyczności oraz

Pracowni Obrazowania Mózgu LOBI

Instytutu Biologii Doświadczalnej

im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

Dr hab. Kalina Burnat

Warszawa, 2024

Oświadczenie autora

Ja, niżej podpisana Anna Kozak wyrażam zgodę na przechowywanie i udostępnianie mojej pracy doktorskiej pt.

“Implikacje behawioralne i analiza zmian zachodzących w istocie białej pod wpływem lezji siatkówkowej oraz treningu wzrokowego, zbudowanego w oparciu o bodziec testowany na pacjentach z uszkodzeniami siatkówki”

przez Bibliotekę Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w formie drukowanej, w czytelni oraz w ramach wypożyczeń międzybibliotecznych, na zasadach dozwolonego użytku. Jednocześnie udzielam Bibliotece Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN nieodpłatnej licencji niewyłącznej na korzystanie z w. w. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji:

1) umieszczenie treści pracy w formie pliku pdf wraz z metadanymi, w repozytorium cyfrowym RCIN (Repozytorium Cyfrowe Instytutów Naukowych, kolekcja: Instytut Biologii Doświadczalnej PAN/ Prace dyplomowe) znajdującym się pod adresem: https://rcin.org.pl/dlibra/collectiondescription/121

2) zwielokrotnienie utworu techniką cyfrową (digitalizacja pracy w przypadku konieczności skanowania wersji drukowanej)

Warszawa, dnia 20-12-2024

Badania opisane w niniejszej pracy zostały częściowo sfinansowane w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki 2015/19/B/NZ4/03045 „Poza świadomym widzeniem - potencjalne źródło terapii wzroku”

SERDECZNIE DZIĘKUJĘ:

Mojej Promotorce, **dr hab. Kalinie Burnat** za opiekę naukową, pomoc merytoryczną zaangażowanie, a przede wszystkim motywację do działania i wyrozumiałość na wielu polach.

Prof. dr hab. Małgorzacie Kossut, za nieocenioną pomoc merytoryczną, i inspirację naukową od zawsze.

Wszystkim członkom **Pracowni Neuroplastyczności**, z którymi miałam przyjemność pracować przez wszystkie lata jej funkcjonowania. Za niezwykłą, rodzinną atmosferę i niegasnącą wiarę, za pobudzanie ciekawości i tak ważną codzienność w laboratorium.

Dziękuję moim **Rodzicom**, bez których stałego wsparcia nie byłabym w tym miejscu, w którym jestem.

Dziekuję Wam, **Jean-Christophe** i **Chloé-** jesteście moją siłą.

Spis treści

Spis treści 4
Wykaz skrótów 5
Streszczenie 6
1. Wstęp 10
1.1 Przetwarzanie sygnałów w układzie wzrokowym 10
1.2 Plastyczność układu wzrokowego 11
1.3 Zwierzęce modele uszkodzeń siatkówki 16
1.4 Rehabilitacja wzrokowa, znaczenie motywacji 21
1.5 Układ wzrokowy kota jako homolog układu wzrokowego człowieka 24
2. Założenia i cele pracy 26
3. Projekt testu ostrości widzenia: równoległa ocena percepcji kształtu i ruchu. 28
3.1 Metody 28
3.1.1 Osoby badane 28
3.1.2 Bodźce wzrokowe 30
3.1.3 Procedura badawcza 33
3.1.4 Statystyczna analiza danych behawioralnych 36
3.2 Wyniki 37
3.2.1 Grupa kontrolna 37
3.2.2 Pilotażowe wyniki pacjentów z uszkodzeniem siatkówki 42
3.3 Dyskusja 43
4. Analiza wpływu treningu rozpoczętego bezpośrednio po indukcji uszkodzenia siatkówki, na funkcje wzrokowe 48
4.1 Metody 48
4.1.1 Zwierzęta, procedura i lezja 48
4.1.2 Aparat doświadczalny 53
4.1.3 Procedura treningu 53
4.1.4 Bodźce wzrokowe 55
4.1.5 Akwizycja i obróbka danych MRI 61
4.1.6 Przygotowanie danych dyfuzyjnych do analizy opartej na miarach ‘fikselowych’ (FBA) i tensorze dyfuzji (FA) 62
4.1.7 Statystyczna analiza danych 64
4.2 Wyniki 69
4.2.1 Wyniki analizy danych dyfuzyjnych opartej na miarach “fikselowych” (FBA) 69
4.2.2 Wyniki analizy danych dyfuzyjnych opartej na tensorze dyfuzji w zdefiniowanych obszarach zainteresowania (ROI) 73
4.3 Wyniki behawioralne 75
4.3.1 Cztery tygodnie po lezji 76
4.3.2 Cztery - osiem tygodni po lezji 77
4.3.3 Osiem - dwanaście tygodni po lezji 79
4.4 Dyskusja 80
4.4.1 Porównanie opisów istoty białej - modele oparte na tensorze dyfuzji 82
4.4.2 Wpływ lezji i treningu na istotę białą 85
5. Podsumowanie i wnioski 90
6. Lista cytowanych publikacji 93
7. Publikacje Doktorantki 107

Wykaz skrótów

CN (**c**audate **n**ucleus) - jądro ogoniaste

dLGN (**d**orsal **l**ateral **g**eniculate **n**ucleus) - grzbietowa część ciała kolankowatego bocznego

DTI (**d**iffusion **t**ensor **i**maging) - obrazowanie tensora dyfuzji

ETDRS (**E**arly **T**reatment **D**iabetic **R**etinopathy **S**tudy)- wieloośrodkowe badanie weryfikujące skuteczność fotokoagulacji laserowej w spowalnianiu rozwoju retinopatii cukrzycowej

FA (ang. **f**ractional **a**nisotropy) - frakcjonowana anizotropia

FBA (**f**ixel **b**ased **a**nalysis) - analiza danych dyfuzyjnych oparta na ‘fixelu’

FC (**f**iber **c**ross-section) - przekrój przez wiązkę włókien

FD (**f**iber **d**ensity) - gęstość włókien w obrębie wiązki

FDC (**f**iber **d**ensity and **c**ross section) - przekrój poprzez wiązkę włókien i gęstość włókien w obrębie wiązki

GABA (**g**amma-**a**mino**b**utyric **a**cid) - kwas gamma-aminomasłowy

LPZ (**l**esion **p**rojection **z**one) - obszar korowej reprezentacji lezji

MD (**m**acular **d**egeneration) - zwyrodnienie plamki żółtej

MRI (**m**agnetic **r**esonance **i**maging) - obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

PMLS/(V5/MT) (**p**osteromedial **l**ateral **s**uprasylvian **c**ortex) – środkowe pole skroniowe

RDP (**r**andom **d**ot **p**attern) - wzór losowo rozmieszczonych kropek

RP (**r**etinitis **p**igmentosa) - barwnikowe zwyrodnienie siatkówki

STGD (**st**ar**g**ardt **d**isease) - choroba Stargardta

V1 (primary visual cortex) - pierwszorzędowa kora wzrokowa

Streszczenie

Zwyrodnienie centralnej siatkówki jest główną przyczyną utraty wzroku u osób dorosłych. W toku pracy doktorskiej przeprowadzono dwie serie badań: z udziałem ludzi i na zwierzęcym modelu uszkodzenia centralnej siatkówki, mające na celu zbadanie wpływu treningu wzrokowego na zmiany zachodzące po uszkodzeniu siatkówki. Najpierw, zaprojektowany został test wzrokowy, umożliwiający pomiar ostrości widzenia, oparty na postrzeganiu ruchu. Test ostrości polegał na odróżnianiu figur, kółka od elipsy złożonych z poruszających się kropek. Poziom ostrości widzenia został zweryfikowany w grupie osób zdrowych i wstępnie przetestowany u pacjentów cierpiących na barwnikowe zwyrodnienie siatkówki (ang. retinitis pigmentosa, RP) i chorobę Stargarda (STGD). Obie grupy pacjentów cierpią na postępującą degenerację fotoreceptorów, pacjenci RP w obszarze peryferycznej siatkówki, a pacjenci STDG w obszarze centralnej siatkówki. Także, zaproponowano mechaniczny model uszkodzeń peryferycznej siatkówki, zawężając u osób zdrowych, przy pomocy gogli spawalniczych, peryferyczne pole widzenia. Wyniki behawioralne testu ostrości widzenia opartego na ruchu pokazały, że szybki ruch kropek w negatywnym kontraście jest najtrudniejszy dla osób zdrowych w pełnym polu widzenia (Kozak i in., 2021).

W drugiej serii badań wykorzystano zwierzęcy model uszkodzenia centralnej siatkówki u dorosłych kotów, które poddano obuocznej fotokoagulacji centralnej siatkówki. Skany MRI przeprowadzono przed i po uszkodzeniu siatkówki, w 5 punktach czasowych i u dwóch grup kotów: naiwnych i trenowanych. Dodatkowo przebadana została kontrolna grupa zwierząt. Koty z lezją siatkówki wykonywały zadania wzrokowe oparte na ruchu lepiej: poziom prawidłowo udzielanych odpowiedzi był wyższy niż w grupie kontrolnej. Następnie

przeprowadzono analizę danych dyfuzyjnych FBA (ang. fixel based analysis, FBA). U kotów naiwnych, nietrenowanych (RLN) obniżenie wartości metryk FBA wynosiło 40-15% w porównaniu do grupy kontrolnej. Zmiany metryk obejmowały włókna we: wrażliwej na ruch okolicy wzrokowej V5, wzgórkach czworaczych górnych (dLGN), hipokampie, jądrze ogoniastym i w paśmie wzrokowym. Natomiast u kotów trenowanych po lezji, obserwowane zmiany były bardziej ograniczone przestrzennie, a obniżenie wartości metryk FBA było mniejsze niż w przypadku grupy kotów RLN. Aby śledzić dynamikę czasową zmian po uszkodzeniu, przeprowadzono analizę tensorową anizotropii frakcyjnej (ang. fractional anizotropy, FA). Wartości FA u naiwnych zwierząt z lezją wzrastały szybko po uszkodzeniu, podczas gdy u zwierząt trenowanych po uszkodzeniu pozostawały na tym samym poziomie. Otrzymane przez nas wyniki wskazują na stabilizujący efekt treningu, który zatrzymuje lub ogranicza zmiany spowodowane lezją (Kozak i in., 2024). Sugerujemy zatem, że trening wzrokowy ukierunkowany na funkcje wzrokowe związane z ruchem, właściwe dla obszarów wzrokowych otrzymujących informacje z aktywnej, peryferycznej części siatkówki może doprowadzić do częściowego przejęcia funkcji, które w warunkach normalnych zależą od centralnego widzenia.

Abstract

Macular degeneration is the leading cause of vision loss in adults. In this condition, the photoreceptor cells within the central retina, undergo progressive degeneration, leading to a gradual loss of high-acuity vision. During the doctoral research, two series of studies were conducted in order to investigate the impact of visual training on changes occurring after retinal damage: one involving human and the other one using an animal model of central retinal damage. At first, a visual test was designed to measure visual acuity based on motion perception. The motion-acuity test involved distinguishing a circle from an ellipse made up of moving dots. The level of visual acuity was verified in a group of healthy individuals and preliminarily tested in patients suffering from retinitis pigmentosa (RP) and Stargardt disease (STGD). Both patient groups suffer from progressive degeneration of photoreceptors: RP patients in the peripheral retina and STGD patients in the central retina. To assess the feasibility of modeling peripheral retinal damage we restricted the peripheral visual field in healthy controls using welding goggles. Obtained results showed that fast motion of dots in negative contrast is the most difficult for healthy individuals (Kozak et al., 2021).

In the second study, an animal model of macular degeneration was used in adult cats, which underwent bilateral photocoagulation of the central retina. Control animals and two groups of cats with retinal damage, naive and trained, were tested. 7 T-MRI scanning was performed before and after lesioning at 5 different timepoints. Cats with retinal lesions performed motion-based visual tasks with higher level of correct responses than control animals. Next, a fixel-based analysis (FBA) of diffusion data was conducted. In naive, untrained cats (RLN), the reduction in FBA metrics was 40-15% compared to the control group. Changes in the

metrics affected fibers in the motion-sensitive visual area V5, the superior colliculi, hippocampus, caudate nucleus, and the optic tract. In contrast, trained cats with retinal lesions showed more spatially limited changes, and the reduction in FBA metrics was smaller compared to the RLN group. To track the temporal dynamics of changes after injury, fractional anisotropy (FA) tensor analysis was performed. FA values in naive, lesioned animals increased rapidly after the lesion, while in trained lesioned animals, the values remained stable. Our results show the stabilizing effect of training, which halts or limits the changes caused by the lesion (Kozak et al., 2024). In conclusion, we suggest that visual training focused on motion-related visual functions, specific to visual areas receiving input from the active peripheral part of the retina, may lead to a partial takeover of functions typically dependent on central vision.

1. Wstęp

1.1 Przetwarzanie sygnałów w układzie wzrokowym

Teoria, zgodnie z którą siatkówka działała jak aparat fotograficzny, była dominującym poglądem w XIX wieku, jednak stopniowo zaczęto dostrzegać, że jej rola jest znacznie bardziej złożona. Ważnym momentem w zmianie tego poglądu były badania prowadzone przez Davida Hubela i Torstena Wiesela, którzy odkryli, że siatkówka i kora wzrokowa współdziałają w bardziej złożony sposób. Badania te, które rozpoczęły się w latach 50. XX wieku, wykazały, że siatkówka dokonuje wstępnej obróbki sygnałów wzrokowych, takich jak rozróżnianie kształtów, kontrastu i kolorów, zanim sygnały te trafią do kory wzrokowej.

Dziś wiadomo już, że przetwarzanie sygnału wzrokowego rozpoczyna się już na poziomie siatkówki, na poziomie fotoreceptorów, gdzie informacja o kolorze jest segregowana przez czopki, w zależności od długości fal niosących daną informację (Schmidt i in., 2019). Następnie, sygnał transmitowany do warstw komórek siatkówki, komórek dwubiegunowych i amakrynowych gdzie rozpoczyna się dalsza analiza, w obrębie równoległych szlaków ON i OFF (odpowiednio dla jasnego i ciemnego kontrastu, Wu i in., 2000). Sygnały z dwóch oddzielonych ścieżek (odrębnych dla komórek dwubiegunowych szlaku Oni OFF) są przekazywane do komórek amakrynowych i komórek zwojowych siatkówki. Komórki zwojowe formują włókna nerwowe, które tworzą nerw wzrokowy. Nerw wzrokowy przekazuje sygnały dalej do ciała kolankowatego bocznego (część wzgórza), które jest głównym przekaźnikiem informacji wzrokowej do pierwszorzędnej kory wzrokowej (V1), znajdującej się w płacie potylicznym. Równocześnie, część sygnałów z ciała kolankowatego bocznego jest kierowana do struktury poduszki będącą częścią wzgórza, która bierze udział w wyższych procesach przetwarzania wzrokowego,

szczególnie w kontekście uwagi wzrokowej i koordynacji ruchów oczu. Z poduszki sygnały mogą być przekazywane do różnych obszarów kory wzrokowej, w tym do obszarów odpowiedzialnych za przetwarzanie przestrzenne (droga grzbietowa) oraz rozpoznawanie obiektów (droga brzuszna). Równocześnie część sygnałów z ciała kolankowatego bocznego jest kierowana do wzgórków czworaczych górnych, biorących udział w odruchach wzrokowych, takich jak reagowanie na ruch w polu widzenia, zwłaszcza w kontekście koordynacji wzroku z ruchem ciała. Następnie, sygnały te przesyłane są do kory wzrokowej oraz śródmózgowia, odpowiedzialnych za dalsze przetwarzanie informacji wzrokowej.

Zatem, przetwarzanie wzrokowe rozpoczyna się w siatkówce, gdzie odrębne aspekty sygnału wzrokowego, jak ruch czy kolor, kodowane są przez odpowiadające im funkcjonalnie szlaki neuronowe (Ichinose i Habib, 2022). Taka analiza sygnału wzrokowego osiągnięta na drodze równoległego przetwarzania, oznacza, że różne cechy sygnału wzrokowego są kodowane przez odrębne szlaki neuronalne i równolegle analizowane (Wassle, 2004). Dwa główne szlaki zaangażowane w przetwarzanie równoległe to szlak wielkokomórkowy, rozpoczynający się od wielkokomórkowych komórek zwojowych siatkówki, kodujący informację o ruchu i zmianach zachodzących w przestrzeni, oraz szlak drobnokomórkowy komórek zwojowych siatkówki, zaangażowany w przetwarzanie kształtu i koloru (Ichinose i Habib, 2022).

1.2 Plastyczność układu wzrokowego

Czy istnieje możliwość powstawania nowych połączeń między komórkami nerwowymi w dorosłym mózgu? Czy podziały komórkowe ustają po zakończeniu rozwoju? Te pytania były w neurobiologii jednymi z najbardziej nierozwikłanych przez lata. Regeneracyjne zdolności układu nerwowego, rozumiane jako możliwość tworzenia się nowych połączeń

pomiędzy neuronami, były przez naukowców negowane, a pogląd hiszpańskiego neuroanatoma i histologa- Ramona y Cajala, zawarty w zdaniu: „W dorosłych ośrodkach nerwowych szlaki nerwowe są ustalone, zakończone, nie do zmienienia. Wszystko może umrzeć, nic nie zregeneruje" (1913), stał się dogmatem na kilkadziesiąt lat. Dopiero w latach 40 XX, Jerzy Konorski w swojej książce "Conditioned Reflexes And Neuron Organization" wprowadza po raz pierwszy pojęcie plastyczności, definiowanej jako trwałe przekształcenia w układach neuronalnych, prowadzące do zmian plastycznych. W 1965 roku Altman i Dads zaobserwowali nowopowstające neurony w mózgu szczurów (Altman i Das, 1965). Wraz z rozwojem i dostępnością metod, neurogeneza w dorosłym mózgu stawała się coraz bardziej dostrzegana, a w 1983 roku Goldman i Nottebohm pokazali neurogenezę zachodzącą w mózgu dorosłych kanarków. W 1998 Eriksson wraz zespołem zbadali skrawki hipokampów chorych na nowotwór pacjentów i metodą znakowania fluorescencyjnego dla bromodeoksyurydyny oraz jednego z markerów neuronalnych: NeuN- białka jądrowego specyficznego dla dojrzałych neuronów; kalbindyny lub NSE-neuroswoistej enolazy pokazali, że nowe neurony, definiowane obecnością wymienionych markerów, powstają w zakręcie zębatym hipokampa w dorosłym mózgu (Eriksson i in., 1988). Dziś neuroplastyczność jest powszechnym przedmiotem badań, a powstawanie nowych technik obrazowania otwiera coraz więcej możliwości.

Neuroplastyczność jest zdolnością układu nerwowego do adaptacji, w odpowiedzi na zachodzące w środowisku zmiany, przebyte urazy, czy doświadczenia sensoryczne (Pascual-Leone i in., 2005). Wcześnie w rozwoju osobniczym, w trakcie tzw. okresów krytycznych, potencjał plastyczny układu nerwowego jest najsilniejszy, a deprywacje sensoryczne podczas ich trwania powodują znaczne zmiany morfologiczne ośrodków korowych, co uniemożliwia dalszy prawidłowy rozwój funkcji sensorycznych (Wiesel i Hubel, 1963; Castaldi i in., 2020). W rozwijającym się układzie wzrokowym zachodzą

okresy krytyczne, które charakterystyczne są dla konkretnych funkcji wzrokowych (np. selektywność orientacji, preferencja kierunku, widzenie kontrastu, głębi czy koloru). w czasie tych okresów krytycznych jakość stymulacji dotycząca konkretnej funkcji jest determinantem dla prawidłowego widzenia. Poszczególne funkcje wzrokowe rozwijają się w różnym czasie i tempie. Najbardziej popularnym paradygmatem wykorzystywanym w badaniach nad plastycznością układu wzrokowego jest jednooczna deprywacja poprzez np. zaszycie powieki jednego oka. W 1963 roku, Hubel i Wiesel pokazali podczas badań nad jednooczną deprywacją i jej wpływem na odpowiedź komórkową w okolicach wzrokowych i ciele kolankowatym bocznym, że zachodzi redukcja połączeń z zasłoniętego oka do ciałka kolankowatego bocznego, a na poziomie pierwszorzędowej kory wzrokowej dochodzi do reorganizacji na poziomie kolumn dominacji ocznej w taki sposób, że tylko mała liczba neuronów pozostaje aktywna w odpowiedzi na stymulacje z oka deprywowanego. Te reorganizacje widoczne były tylko na wczesnym etapie rozwoju, natomiast analogiczna deprywacja u kotów dorosłych nie prowadziła do zmian (Wiesel i Hubel, 1963). Wkład tych badaczy w rozumienie mechanizmów przetwarzania informacji wzrokowych został w 1981 roku uhonorowany nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Zauważalny we wczesnych badaniach brak zmian zależnych od doświadczenia u dorosłych, po ukończeniu okresów krytycznych doprowadził w konsekwencji do przekonania, że o ile funkcje wyższego rzędu jak pamięć mogą podlegać neuroplastycznym zmianom niezależnie od okresów krytycznych, to zmiany w układzie wzrokowym uznawane były jako ograniczone do tych okresów, a po ich zamknięciu- niemożliwe. Jednak szereg badań zarówno na modelach zwierzęcych jak i na ludziach wskazał na możliwy zachowany potencjał dla zmian plastycznych we wzrokowych obszarach korowych, a reorganizacje na niezależne od okresów krytycznych. Zarówno neuroanatomiczne i neurofizjologiczne (e.g., Kaas i in., 1990; Eysel i in., 1999; Giannikopoulos i Eysel, 2006;

Keck i in., 2008, 2011; Gilbert i Li, 2012) jak i molekularne (Baekelandt i in., 1994; Arckens i in., 1998; Qu i in., 2003; Hu i in., 2009, 2011; Smolders i in, 2016; Pereira i in., 2022) badania mechanizmów stojących za topograficzną reorganizacją w następstwie nagłej utraty centralnego widzenia w konsekwencji uszkodzenia siatkówki wykazały mechanizmy neuroplastyczne układu wzrokowego dorosłych zwierząt: kotów, małp czy myszy. Na przykład zespół Profesora Kaas pokazał, że jednostronna lezja centralnej siatkówki, obejmująca od 5 do 10 stopni przy jednoczesnym pozbawieniu stymulacji wzrokowej drugiego oka, w zakresie odpowiadającym lezji, spowodowała zmiany w obrębie reprezentacji uszkodzonego obszaru w pierwszorzędowej i drugorzędowej korze wzrokowej, po stronie przeciwnej do oka uszkodzonego. Neurony kory wzrokowej, z polami recepcyjnymi w obrębie reprezentacji lezji uzyskały nowe pola recepcyjne, w obszarach siatkówki otaczających lezje. Obserwowane zmiany wskazują na możliwość dostosowania się dorosłego układu wzrokowego do zachodzących zmian i odzyskanie funkcji po przebytym uszkodzeniu.

Zespół Profesora Eysel pokazał, że zmiany w dorosłym układzie wzrokowym mogą zachodzić nie tylko pod wpływem uszkodzenia siatkówki, ale również w następstwie uszkodzeń korowych. Porównanie tych dwóch typów uszkodzeń przeprowadzonych w modelu kocim pokazało, że obie lokalizacje lezji skutkowały podobną dynamiką aktywności neuronów położonych na granicy korowej reprezentacji lezji (w przypadku lezji siatkówki) i na granicy lezji (w przypadku lezji bezpośrednio na korze wzrokowej). Aktywność tych neuronów była w początkowym okresie po lezji zahamowana, czemu towarzyszył wzrost aktywności w niewielkim obszarze sąsiadującym z obszarem reprezentacji lezji przez pierwsze 1-2 tygodnie. Dodatkowo obserwowana była redukcja hamowania GABA i wzrost pobudzenia glutaminergicznego, co prowadziło do wzrostu w aktywności spontanicznej.

Podobna dynamika czasowa aktywności neuronów i ich pól recepcyjnych w następstwie obuocznych lezji centralnej siatkówki w dorosłym układzie wzrokowym została zaobserwowana przez Profesora Eysel i jego zespół: aktywność w obrębie korowych reprezentacji lezji była początkowo wyciszona, ale z czasem powracała. Rejestracje z pojedynczych neuronów były przeprowadzane do 12 miesięcy po lezji, co pozwoliło zaobserwować, że szczyt aktywności przesuwał się z granicy reprezentacji w kierunku jej centrum, a z czasem pole recepcyjne komórki rozwijało położenie ektopowe, czyli zmieniało swoją lokalizację pod wpływem lezji. Początkowo powiększało się a wraz z procesem zdrowienia po lezji, aktywność komórki i wielkość pola recepcyjnego ulegały normalizacji.

Na poziomie molekularnym, zdolność dorosłego układu wzrokowego do zmiany została zaobserwowana min. przez zespół Profesor Arckens (1998). Metodą hybrydyzacji *in situ,* zbadany został wpływ obuocznej lezji na dynamikę czasową ekspresji mRNA dwóch izoform dekarboksylazy kwasu glutaminowego: 67 i 65, w ciele kolankowatym bocznym i korze wzrokowej. Wiadomo, że GABA zaangażowana jest w zmiany plastyczne korowej topografii w następstwie deprywacji sensorycznych w układzie wzrokowym (Jones, 1993), a badania nad układem GABAergicznym w korze wzrokowej kotów po lezji wykazały, że dwa tygodnie po zabiegu zachodziła immunoreaktywność dekarboksylazy kwasu glutaminowego (65 i 67) w uszkodzonych obszarach kory (Rosier i in., 1995). Trzy dni po lezji obserwowany był spadek liczby neuronów z ekspresją dla GAD67 w ciele kolankowatym bocznym, który utrzymywał się 7,5 miesiąca. Opisane powyżej przykładowe badania pokazują, że kora wzrokowa może podlegać zmianom zależnym od doświadczenia, a zdolność ta jest utrzymana w dorosłości.

W modelach zwierzęcych, zmiany plastyczne wywoływane są również dzięki wzbogacaniu środowiska sensorycznego (Baroncelli i in., 2010), deprywację wzrokową poprzez zaszycie

powiek (He i in., 2006), farmakologicznie, poprzez podanie diazepamu (Hensch i in., 1998) czy poprzez aktywność fizyczną (Kalogeraki i in., 2016) i miało to miejsce w dorosłości, po zakończeniu okresów krytycznych.

Niewiele badań skupiało się dotychczas na plastyczności w odpowiedzi na uszkodzenie centralnej siatkówki, występującej poza pierwszorzędową korą wzrokową V1 (Arckens i in., 2000; Burnat i in., 2017; Keliris i in., 2022). Z badań na kotach wiadomo, że w przypadku obszarów wzrokowych wyższego rzędu w obrębie LPZ, w odpowiedzi na nagłą utratę dopływu stymulacji wzrokowej widoczny był początkowy spadek ekspresji markera aktywności molekularnej *zif268*. Wraz z czasem następował częściowy jej wzrost, będący świadectwem dla reaktywacji neuronalnej (Burnat i in., 2017). Jedynie we wrażliwym na ruch korowym obszarze PMLS/V5, który nie był bezpośrednio dotknięty centralną lezją, nie zaobserwowano początkowego spadku ekspresji *zif268* natomiast 12 tygodni po lezji widoczny był istotny jej wzrost. W badaniach na ludziach natomiast, w celu obserwacji potencjalnych zmian plastycznych w obrębie układu wzrokowego, prowadzących do poprawy funkcji, najczęściej wykorzystuje się trening percepcyjny. Pacjenci z ubytkami pola widzenia poddawani są treningowi wzrokowemu, mającemu poprawić ich osłabione funkcje (Sabel i in.,) czy czasową deprywację wzrokową (Binda i in., 2018).

1.3 Zwierzęce modele uszkodzeń siatkówki

Modele zwierzęce od lat są szeroko stosowane w badaniach nad uszkodzeniami siatkówki, które występują u ludzi. O ile współczesna technologia badań neuroobrazowych znacznie poszerzyła spektrum możliwych procedur wykonywanych *in vitro* na pacjentach, to badania *in vivo* często pozwalają na dokładniejszą kontrolę zmiennych oraz większą inwazyjność wykonywanych procedur. Uznanie, że zaburzenia siatkówki u zwierząt mają cechy zbliżone

do ludzkich, nie tylko w sposób radykalny wpłynęło na zrozumienie patogenezy tych zaburzeń, ale także pozwoliło na testowanie ewentualnych procedur leczenia (Fletcher i in., 2011). Trafny model zwierzęcy choroby występującej u ludzi, powinien, poza dostarczaniem informacji o jej patogenezie, pozwalać na odtworzenie charakterystycznych cech choroby oraz być przydatny w testowaniu strategii terapeutycznych. Do takich modeli należą opisane poniżej zwierzęce modele jaskry czy zwyrodnienia plamki żółtej (ang. *macular degeneration*, MD). Warto jednak pamiętać, że pomimo tego, wciąż obecnych jest szereg zaburzeń, dla których modele zwierzęce nie oddają w sposób adekwatny warunków chorób u ludzi. Do takich zaburzeń zaliczają się te, na których rozwój wpływa szereg czynników i ich wzajemnych oddziaływań, np. genetycznych i środowiskowych, takich jak klimat czy dieta. Co więcej, należy pamiętać, że wśród modeli zwierzęcych można wyszczególnić także te, wymagające inwazyjnych interwencji jak np. lezje, czy manipulacja ciśnieniem w gałce ocznej czy operacje przecięcia nerwu i w poniższej pracy scharakteryzowane zostały modele z tej grupy. Do takich modeli należą np. zwierzęce modele jaskry, w których najczęściej wykorzystywane są gryzonie, ale też koty (Dietrich, 2005), a w celu wywołania jaskry stosuje się: podwyższenie ciśnienia śródgałkowego; zmiażdżenie nerwu wzrokowego; ekscytotoksyczność (tj. toksyczność wywołaną neurotransmiterem pobudzającym, Fiedorowicz et. al., 2011). Uszkodzenie siatkówki metodą koagulacji od dawna było stosowane w zwierzęcym modelu MD (Noell et al, 1966). Według autorów (Eysel i in., 1980; Arckens i in., 2000; Marc et al, 2008) stanowi ono wierniejszy model MD niż mysie modele transgeniczne (Rakoczy et. al, 2006), szczególnie biorąc pod uwagę zaawansowaną postać tej choroby. Jednakże, patogeneza po lezji uzyskanej metodą koagulacji laserowej, w przeciwieństwie do faktycznej choroby, przebiega szybko, a uszkodzenie fotoreceptorów jest natychmiastowe w całym obszarze lezji. Również zespół Lorach (2015) pokazał u królików, że lezje siatkówki metodą

fotokoagulacji laserowej pozwalają na uzyskanie wysoce powtarzalnych zmian degeneracyjnych fotoreceptorów w obrębie zdefiniowanego regionu siatkówki, stanowiąc wiarygodny model do badań. Niezwykle ważną kwestię w rozważaniach o zwierzęcych modelach MD stanowi fakt, że gryzonie jako zwierzęta nocne nie posiadają plamki żółtej ani jej odpowiednika. Dlatego też, w modelach zaburzeń dotyczących tego regionu, ważną rolę pełnią modele oparte na ssakach z zaawansowanym układem wzrokowym, a w szczególności na kotach (Blake i in., 1978; Pasternak i in., 1983; Winkler i in., 2020), ponieważ obecny jest u nich odpowiednik ludzkiej plamki żółtej- *area centralis* (Rapaport i Stone, 1984; Occelli, i in., 2022) Obszar ten, ulokowany blisko centrum siatkówki, charakteryzuje specjalizacja w przetwarzaniu wzrokowym o wysokiej rozdzielczości (Rapaport i Stone, 1984). Area centralis posiada wiele właściwości wspólnych z plamką żółtą: jest to obszar pozbawiony naczyń krwionośnych, z najwyższą koncentracją czopków i komórek zwojowych (Pasternak i in., 1983). Na wyższych piętrach układu wzrokowego obserwuje się zwiększoną reprezentację tego obszaru w porównaniu do obszarów bardziej rozległych, a liczne badania fizjologiczne pokazały, że neurony w jego obrębie posiadają mniejsze pola recepcyjne w porównaniu do dalszych obszarów siatkówki (Peichl i Wassle, 1979; Wiesel, 1960).

Badania wykorzystujące lezje siatkówki w modelach zwierzęcych stanowiły ważny wkład w rozumienie wpływu utraty funkcji wzrokowych na procesy plastycznej reorganizacji w korze wzrokowej. Zespół Eysel i in., (1999) pokazał, że charakterystyczna kaskada zmian plastycznych w obszarze kory wzrokowej indukowana może być lezją: siatkówkową jak i korową. Uszkodzenia te prowadziły do zredukowania hamującego wpływu GABA i wzrostu pobudzającego wpływu glutaminianu, co w konsekwencji skutkowało wzrostem aktywności spontanicznej i pobudliwości, inicjując lokalne reorganizacje korowe: obuoczna, centralna lezja początkowo wycisza obszar korowej reprezentacji lezji (ang:

lesion projection zone, LPZ) w pierwszorzędowej korze wzrokowej (V1), a z czasem neurony w obrębie uszkodzenia zaczynają na nowo odpowiadać na wzrokową stymulację, dochodzącą z tych regionów siatkówki, które nie uległy uszkodzeniu (Gilbert i Li, 2012; Giannikopoulos i Eysel, 2006).

W badaniach wykorzystywane były symetryczne, obuoczne centralne lezje, stanowiące model MD (np. Burnat i in., 2017), ale także lezje jednostronne (Smolders, 2016) lub lezje zlokalizowane poza centralną siatkówką (Waleszczyk i in., 2003). W swojej pracy przeglądowej, Dreher i inni (2001) podkreślają, że badania na dorosłych zwierzętach, które poddane zostały obu- lub jednoocznej lezji siatkówkowej, stanowiły ważny wkład w rozumienie dynamiki pól recepcyjnych w różnym czasie po wykonaniu lezji. Komórki w obrębie LPZ z różną dynamiką czasową po wykonaniu lezji: od kilku godzin, tygodni i miesięcy, charakteryzowały się się polami recepcyjnymi, które były przemieszczone w kierunku zdrowej siatkówki.

Zespół Pereira i współpracowników (2022) wykorzystał obuoczne lezje siatkówki u małp do prześledzenia dynamiki czasowej z jaką zachodzą zmiany plastyczne w obrębie ciała kolankowatego bocznego. Śledząc zmiany zachodzące w ekspresji: białka związanego ze wzrostem 43 (GAP43), kwaśnego białka włókienkowego gleju (GFAP) i parwalbuminy (PV) i kalbindyny (CB), zaobserwowano, że w obrębie LPZ, ekspresja GFAP, GAP43, PV i CB wzrastała i spadała w poszczególnych warstwach ciała kolankowatego bocznego (dLGN), krótko po wykonaniu lezji, i wracała do poziomu początkowego z różną dynamiką czasową. Ponadto, jednooczne lezje przynosowej części siatkówki wykonane na modelu kocim, pokazały również zmiany w obrębie dLGN (Eysel i in., 1980). Różnice w stosunku do normalnej organizacji topograficznej były widoczne 30 dni po wykonaniu lezji i później. Pola recepcyjne komórek zarejestrowanych blisko granicy lezji, wykazywały się przesunięciem o ponad 2 stopnie kątowe w stosunku do lokalizacji sprzed lezji.

Model małpi wykorzystany został również w badaniu Keliris i inni (2022). Obuoczna lezja siatkówkowa stanowiła wyjście do badań nad powstawaniem plastycznych zmian topograficznych w wyższych obszarach wzrokowych - V2, V3. Do tej pory badania skupione były głównie na pierwszorzędowej korze wzrokowej - V1. Dzięki temu badaniu i wykorzystaniu neuroobrazowania fMRI, możliwe było pokazanie, że wzrokowe obszary korowe wyższego rzędu nie tylko posiadają zdolności reorganizacji przestrzennej w następstwie lezji, wyrażone poprzez zmianę wielkości pól recepcyjnych, ale reorganizacje te mogą wychodzić poza obszar kory V1. Jednakże wnioski te zostały wysnute na podstawie badania jednego osobnika (Keliris i in., 2022).

Analiza korowych reorganizacji przestrzennych w następstwie lezji siatkówkowych stanowi wartościowy model w badaniach mechanizmów plastyczności na poziomie zarówno pól recepcyjnych, obwodów neuronalnych jak i mechanizmów molekularnych. Początkowe ustalenia dotyczące możliwych reorganizacji zachodzących w układzie wzrokowym zakładały istnienie tzw. okresów krytycznych na wczesnym etapie rozwoju. W swoich badaniach, Wiesel i Hubel pokazali, że ograniczenie dopływu bodźców wzrokowych przez zamknięcie oczu, zmienia połączenia wzgórzowo-korowe ale tylko podczas pierwszych miesięcy życia (Hubel i Wiesel, 1963, 1970; Hubel i in., 1977). W następstwie tych badań, nagrodzonych Noblem, długo dominował pogląd mówiący o tym, że wszelkie właściwości neuronów kory wzrokowej są już ostatecznie zdefiniowane w wieku dorosłym, a zmiany zachodzące po zamknięciu tych okresów krytycznych nie są możliwe. Badania z wykorzystaniem lezji siatkówki pokazały jednak, że nawet dorosła kora wzrokowa jest zdolna do reorganizacji pod wpływem uszkodzenia, a zachodząca plastyczność nie jest ograniczona występowaniem okresów krytycznych (Gilbert i Li, 2012). Co więcej, ich ponowne otwarcie jest możliwe. Badanie opisane w poniższej rozprawie wpisuje się w ten nurt, pokazując możliwość zachodzenia zmian w dorosłym układzie wzrokowym.

1.4 Rehabilitacja wzrokowa, znaczenie motywacji

Dotychczasowe badania nad strategiami prowadzącymi do odzyskiwania funkcji wzrokowych można podzielić na dwie kategorie: 1. bazujące na stymulacji ruchów gałek ocznych, np. poprzez naukę podążania za punktem świetlnym (Das i Huxlin 2010; Rosengarth i in., 2013), oraz 2. oparte na stymulacji percepcyjnej polegające na prostych zadaniach dyskryminacji ruchu lub tekstury (Sabel, 2011). Oba wymienione paradygmaty wykorzystywane są u pacjentów z uszkodzeniami układu wzrokowego na różnych jego poziomach- od siatkówki poprzez nerw wzrokowy aż do uszkodzeń okolic kory wzrokowej. Jednak wyniki tych badań pozostają niespójne- część pacjentów osiąga poprawę, u innych nie obserwuje się żadnych istotnych zmian związanych z treningiem. Różnice w osiąganych wynikach mogą częściowo być tłumaczone rodzajem uszkodzenia jak i indywidualnymi różnicami odpowiedzi na uszkodzenie i trening. W rozmaitych rozważaniach, czynnik związany z zewnętrzną nagrodą wykorzystywaną w trakcie treningu nie był do tej pory brany pod uwagę. Zgodnie z naszą wiedzą, zewnętrzna nagroda, na przykład wynagrodzenie finansowe, nie było do tej pory stosowane podczas tego typu treningów. Jedna tylko publikacja opisuje badanie, w którym wykorzystano informację zwrotną, która może być traktowana jako forma nagrody. Jednak wpływ takiej informacji w przypadku niskiego procentu poprawnych odpowiedzi, budzi raczej frustrację aniżeli poczucie bycia nagradzanym (Sabel i in., 2011).

Treningi wzrokowe stosowano również u pacjentów z uszkodzeniami centralnej siatkówki, jak MD (Liu i in., 2012; Sabel i in., 2011). Tacy pacjenci mają charakterystyczne ubytki w ostrości widzenia przy jednoczesnym zachowaniu widzenia ruchu (Rosegarth i in., 2013). Część z nich rekompensuje centralne ubytki widzenia, rozwijając tzw. preferencyjny

siatkówkowy punkt wpatrywania (ang. *preferred retinal locus*, PRL), korzystając z zachowanej części siatkówki jako substytutu uszkodzonego centrum. Chung (2013) udało się nauczyć pacjentów z MD szybszego czytania. Osiągnięte to zostało poprzez prezentowanie zdań rozdzielonych na pojedyncze wyrazy, wyświetlane osobno w krótkim odstępie czasu. Po 6 tygodniach codziennych treningow, zauważono istotna poprawę w szybkości czytania o 10%. Nie zaobserwowano jednak przeniesienia wytrenowanych funkcji na inne: ostrość widzenia czy rozpoznawaną wielkość znaków. Pacjenci po tym treningu owszem - czytali szybciej jednak nie radzili sobie z mniejszymi literami. Plank i współpracownicy (2014) trenowali pacjentów z MD, zarówno o wczesnym i późnym początku choroby, chcąc zweryfikować, czy powtarzalny intensywny trening stymulujący ich PRL wpłynie na poprawę wykonania. Zadaniem pacjentów było rozpoznanie pochylonej linii, która umieszczona była na tle linii horyzontalnych. Podczas każdej próby, prezentowano bodziec, który miał być rozpoznany, a następnie wyświetlany był na ekranie złożonym z losowo rozmieszczonych linii. Poprawa wykonania zadania była obserwowana zarówno u pacjentów jak i w grupie kontrolnej, jednak transfer na inne funkcje nie był obecny.

W przeciwieństwie do badań ludzkich, w których zewnętrzna nagroda nie jest wykorzystywana, badania na zwierzętach wykorzystują nagrody, które są silne i natychmiastowe. Trenowane zwierzęta są na przykład poddawane restrykcjom żywieniowym gdzie nagroda podczas treningu stanowi jedyny posiłek w ciągu dnia.W przeszłości, badana była głównie spontaniczna reorganizacja w następstwie lezji układu wzrokowego, z naciskiem na to, jaki wpływ na uzyskiwane funkcje ma lokalizacja uszkodzenia, zaś efekt treningu był pomijany: uszkodzenia kory wzrokowej (17 i 18) i ich wpływ na rozpoznawanie faktury (V1/V2, de Weerd i in., 1993, 1994), uszkodzenia obszaru

PMLS/V5 i jego wpływ na integrację obiekt-tło (Kruger i in., 1993), czy też wpływ uszkodzenia tego obszaru na rozpoznawanie wzoru (Spear i in., 1983; Ptito i Lepore, 1983).

Uwzględniając możliwość wpływu treningu na odzyskanie funkcji wzrokowych, Huxlin i Pasternak (2004), zadały pytanie, czy deficyty w percepcji ruchu mogą zostać odwrócone i czy ta zmiana wymaga treningu u kotów po uszkodzeniu obszaru korowego PMLS/V5. Podobnie jak w przypadku wszystkich badań prowadzonych na zwierzętach, nagroda była niezwykle silna i zwierzęta były pozbawione żywienia poza sesjami treningowymi. Percepcja ruchu mierzona była za pomocą zestawu bodźców, umożliwiających pomiar progu percepcji kierunku, spójności i jasności. Pozycja ruchu gałek ocznych była kontrolowana, co pozwoliło na aplikowanie treningu w specyficznych lokacjach uszkodzonych lub zachowanych obszarów. Wszystkie zwierzęta osiągnęły normalny poziom jedynie dla kierunku i tylko w obrębie trenowanych lokacji, co pokazało, że wykorzystanie nagrody jest korzystne tylko w odniesieniu do trenowanej funkcji i lokacji.

Zarówno u ludzi jak i u zwierząt, badania pourazowe skupiają się na stymulacji funkcji wzrokowych, takich jak ostrość widzenia czy rozróżnianie kontrastu czy tekstury, poprzez zastosowanie różnych programów treningowych, wykorzystujących bodźce stacjonarne lub ruchome. Co ważne, ubytki widzenia mogą do pewnego stopnia cofnąć się spontanicznie. Prawdopodobnie taka spontaniczna zmiana jest ograniczona w czasie i można mieć nadzieję, że dalsze zmiany plastyczne mogą być wzbudzane treningiem. Celem treningów jest stymulacja tych części pola wzrokowego, które mają zachowane pewne funkcje - tzw. obszary przejściowe, między uszkodzonym i zachowanym polem widzenia (Bergsma i van der Wildt, 2010). W zwierzęcym modelu MD pokazano, że obszary korowe normalnie responsywne na centralną stymulację, są aktywowane poprzez stymulację ich okolic w przypadku indukcji lezji centralnej (Gilbert i in., 2012). Czasowe zmiany w pobudliwości kory wzrokowej w następstwie lezji są dobrze opisane (Hu i in., 2009, Hu i in., 2011),

a wzrost pobudliwości neuronalnej w obszarach otaczających uszkodzenie zostało potwierdzone w zwierzęcym modelu MD, pokazując polepszenie funkcji behawioralnych peryferii wzrokowych, mierzonych poprzez poprawę wykonania zadań wzrokowych opartych na ruchu (Burnat i in., 2017). Może to sugerować, że zachowane obszary układu wzrokowego stanowią potencjalny cel dla treningu.

1.5 Układ wzrokowy kota jako homolog układu wzrokowego człowieka

Na przestrzeni dekad, kot był dominującym gatunkiem w badaniach nad fizjologią układu wzrokowego. Początki wykorzystywania kota w badaniach nad układem wzrokowym sięgają lat 40 kiedy to Granit za pomocą mikroelektrod rejestrował aktywność neuronalną z kociej siatkówki (1947). Istnieje szereg powodów, dla których kot stanowi dobry model do badań nad układem wzrokowym, również ludzkim. Podobnie jak u człowieka, oczy kota zlokalizowane są z przodu głowy, co jest typowe dla gatunków drapieżnych. Dodatkowo, pole widzenia kota, które wynosi w przybliżeniu 200 stopni, niewiele różni się od pola widzenia u człowieka, wynoszącego około 180 stopni. Także ogólny schemat widzenia obuocznego kota, z częściowo przecinającymi się w skrzyżowaniu wzrokowym włóknami wzrokowymi, zbliżony jest do organizacji układu wzrokowego naczelnych, a nie gryzoni, u których to ilość krzyżujących się włókien jest znacznie większa. Na siatkówce kociej znajduje się zagęszczenie komórek zwojowych, czyli *area centralis,* którego ludzkim odpowiednikiem jest plamka żółta. W ich obrębie nie występują również naczynia krwionośne. Właściwości pól recepcyjnych kota również zbliżone są do właściwości pól recepcyjnych naczelnych: zarówno na poziomie siatkówki jak i dLGN, pola recepcyjne charakteryzuje ułożenie koncentryczne, a komórki zwojowe są zróżnicowane anatomicznie i funkcjonalnie u obu gatunków (Blake, 1979). W korze wzrokowej kota wyróżnić można

wyspecjalizowane obszary jak pola wzrokowe 17,18 i 19 (Hubel i Wiesel, 1962, 1965a; Tusa, Palmer, Rosenquist, 1978), których odpowiednikami u naczelnych są kolejno okolice V1, V2 i V3 (Payne, 1993). Okolicy V4 u naczelnych, odpowiadają kocie okolice 21a i 21b (Payne, 1993). Również ważna z perspektywy tej pracy, wrażliwa na ruch okolica PMLS/V5 ma swój odpowiednik u kota: PMLS. Także dobrze opisany dLGN, charakteryzuje się warstwową budową zarówno u człowieka jak i u kota.

Podobnie jak u naczelnych, w okolicach wzrokowych kota, obszar kory, który odpowiada na stymulację w centralnym polu widzenia jest nieproporcjonalnie duży w porównaniu do okolic, które wrażliwe są na bodźce dochodzące z peryferycznej części pola widzenia (Whitteridge, 1973), a dysproporcja ta jest najbardziej wyraźna we wzrokowej okolicy 17 (Tusa i in., 1978). Widok, który jest odbierany przez pozostające w bezruchu, skupione na jednym punkcie oko, to jednooczne pole widzenia. Dwuoczne pole widzenia to efekt nałożenia się dwóch obrazów, powstałych w każdym oku niezależnie. Układ wzrokowy charakteryzuje topograficzne odwzorowanie siatkówki tzw. retinotopia.

2. Założenia i cele pracy

Zwyrodnienie plamki żółtej (ang. *Macular Degeneration*, MD) dotyka ok. 8% populacji i polega na degeneracji warstwy fotoreceptorów centralnej części siatkówki. Centralna część siatkówki i jej korowa reprezentacja, odpowiedzialna jest przede wszystkim za przetwarzanie stacjonarnych detali, a peryferyczna część odpowiada za procesy uwagowe i postrzeganie ruchu. Bodźce wolne i jasne przetwarzane są w centrum pola widzenia, a szybkie i ciemne- w peryferycznych jego częściach. Celem niniejszej pracy było opracowanie nowego testu do badania ostrości wzroku. Stosując ten test badano wpływ szybkości, kierunku i kontrastu poruszających się kropek w obrębie rozróżnianych figur, na poziom ostrości wzroku. Następnie podjęto próbę dostosowania tego testu do badań behawioralnych zwierząt z kontrolowanym uszkodzeniem centralnej siatkówki, wraz z równoległym podłużnym badaniem istoty białej w rezonansie magnetycznym 7T.

Szczegółowe cele pracy:

1. Sprawdzenie, czy zaprojektowany przez nas test ostrości widzenia pozwala dokonywać pomiarów ostrości widzenia opartych na analizie ruchu i kształtu.

2. Sprawdzenie potencjału diagnostycznego nowego testu u pacjentów z chorobą Stargardta, młodzieńczego wariantu MD, oraz u pacjentów z barwnikowym zwyrodnieniem siatkówki.

3. Sprawdzenie, w zwierzęcym modelu MD, czy wprowadzenie treningu wzrokowego po uszkodzeniu siatkówki ogranicza zmiany wywołane uszkodzeniem i podtrzymuje funkcje widzenia.

4. Fixelowa analiza danych dyfuzyjnych (ang. *fixel based analysis*, FBA) istoty białej w zwierzęcym modelu MD.

5. Analiza tensora anizotropii frakcyjnej (ang. *fractional anisotropy*, FA) obszarów mózgu wyodrębnionych w analizie FBA.

3. Projekt testu ostrości widzenia: równoległa ocena percepcji kształtu i ruchu.

3.1 Metody

3.1.1 Osoby badane

W badaniu wzięło udział osiem zdrowych osób (grupa kontrolna) trzech pacjentów z barwnikowym zwyrodnieniem siatkówki (Retinitis Pigmentosa, RP) oraz dwóch pacjentów z chorobą Stargardta (Stargardt Disease, STGD). Grupa kontrolna została wyłoniona na podstawie rekrutacji, która odbywała się w obrębie pracowników Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN. Każda z osób została poddana rutynowej kontroli okulistycznej: badaniu ostrości wzroku przy pomocy tablic ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study), ocenie percepcji kolorów, badaniu pola widzenia metodą perymetrii statycznej w aparacie Humphreya, badaniu ciśnienia śródgałkowego oraz badaniu dna oka.

Pacjenci z barwnikowym zwyrodnieniem siatkówki charakteryzowali się ograniczonym peryferycznym polem widzenia (tzw. widzenie tunelowe), a centralną jego częścią ograniczoną do 10 stopni, co zostało potwierdzone w badaniu pola widzenia w aparacie Humphreya (badanie wykonane w Samodzielnym Publicznym Klinicznym Szpitalu Okulistycznym, SPKSO). Ostrość wzroku z najlepszą korekcją wynosiła 20/40 lub więcej.

Wykonane zostały również badania elektroretinograficzne, które pozwoliły na ocenę funkcji bioelektrycznej siatkówki. Elektroretinografia błyskowa pełnego pola widzenia (ERG; RETIscan, Roland Consult, Niemcy), wskazała na osłabioną, silniej niż w przypadku

czopków, odpowiedź pręcików, podobnie jak w dystrofii czopkowo-pręcikowej. Wyniki elektroretinografii wieloogniskowej (mfERG) również były nieprawidłowe.

Pacjenci z chorobą Stargardta, charakteryzowali się ubytkami centralnego pola widzenia w granicach 10 stopni. Ostrość wzroku z korekcją wynosiła 20/40 lub więcej. Badanie kliniczne dna oka ujawniło występowanie tzw. ‘bawolego oka’, czyli zaniku w plamce, otoczonego obszarem przegrupowań barwnika. Elektroretinografia błyskowa pełnego pola widzenia (RETIscan, Roland Consult), której wyniki nie są znamienne dla choroby Stargardta, ale pozwalają wykluczyć dystrofię czopkowo pręcikową, uwidoczniła prawidłowe odpowiedzi pręcików oraz normalne lub nieznacznie zredukowane odpowiedzi czopków. Elektroretinografia wieloogniskowa (mfERG), wykazała zredukowane odpowiedzi w obrębie pierścieni centralnych, co wskazuje na nieprawidłowe funkcje plamki żółtej. Optyczna koherentna tomografia (OCT; Cirrus HD-OT Spectral Domain Technology, Zeiss, Niemcy) uwidoczniła zmniejszoną grubość siatkówki, głównie w obrębie dołeczka. Dodatkowo wykonane zostały przesiewowe badania genetyczne, które pokazały mutacje w genie ABCA4 (Scieżyńska i in., 2016).

Wszelkie procedury zostały przeprowadzone zgodnie z odpowiednimi wytycznymi oraz były zaakceptowane przez Komisję Etyczną Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (zgoda KB/157/2017, przyznana Prof. Jackowi Szaflikowi, dyrektorowi Samodzielnego Publicznego Klinicznego Szpitala Okulistycznego).

3.1.2 Bodźce wzrokowe

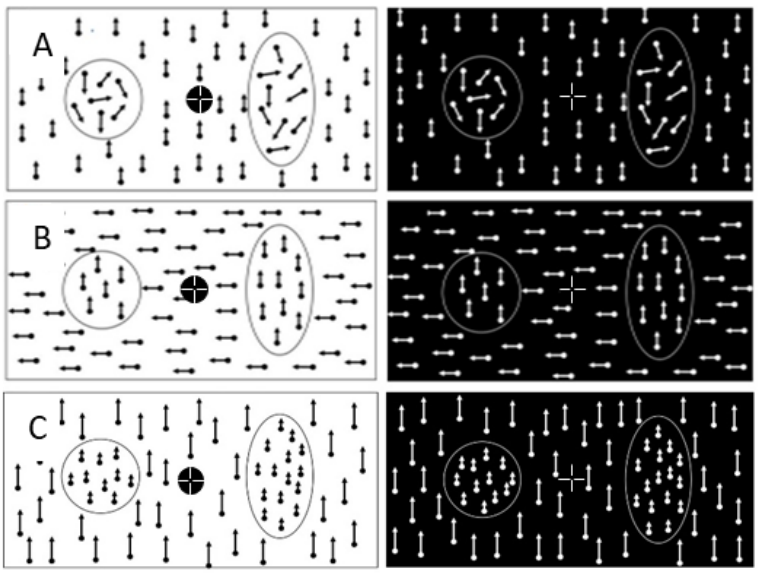
W badaniu wykorzystaliśmy zadanie wzrokowe polegające na rozróżnianiu kształtów- koła oraz elipsy, których powierzchnia była identyczna. Bodziec pozytywny (S+) stanowił koło, a bodziec negatywny (S-)- elipsę w pionie. Zadanie polegało na rozróżnieniu koła od elipsy i zaznaczeniu za pomocą klawiszy klawiatury tej strony ekranu, po której znajdował się S+. Analogiczny bodziec był wcześniej używany w badaniach nad rozwojowymi ubytkami wzrokowymi w zwierzęcym modelu katarakty (Burnat i in., 2005).

W zadaniach opartych na ruchu, koło, elipsa oraz tło, na którym były one wyświetlane, zbudowane były z losowo rozmieszczonych, poruszających się po jednolitym tle kropek. Wykorzystano dwie wersje kontrastu jasności: pozytywny (białe kropki na czarnym tle) oraz negatywny (czarne kropki na białym tle). Kształty były odseparowane od tła na podstawie jednej z cech ruchu: spójności, kierunku lub prędkości.

1. Spójność: S+ i S- składały się z poruszających się losowo kropek, o prędkości 10 stopni na sekundę. Tło zbudowane było z kropek, które poruszały się ruchem spójnym w górę, z prędkością 10 stopni na sekundę (rys. 1A).
2. Kierunek: S+ i S- składały się z kropek poruszających się ruchem spójnym w górę z prędkością 10 stopni na sekundę. Tło składało się z kropek poruszających się ruchem spójnym w lewo, z prędkością 10 stopni na sekundę (rys.1B).
3. Prędkość: Zaprezentowane zostały trzy warunki (a-c). W każdym z nich S+ i S- oraz tło zbudowane były z kropek, które poruszały się spójnym ruchem w górę, a prędkość kropek w S+ i S- zawsze była niższa od prędkości kropek w tle i różnice te wyglądały następująco (S+/- *versus* tło): (rys. 1C):
    a. 10 stopni na sekundę versus 20 stopni na sekundę,
    b. 5 stopni na sekundę versus 10 stopni na sekundę,

c. 1 stopień na sekundę versus 2 stopnie na sekundę.

W każdym z wymienionych warunków, S+ i S- były wyświetlane jednocześnie, w obrębie centralnych 10 stopni pola widzenia, na tle obejmującym 55 stopni pola widzenia.



Rysunek 1. Zadania oparte na ruchu. Zadania polegały na odróżnieniu koła od elipsy. Figury były definiowane przez różne aspekty ruchu: **A.** Spójność. Kropki w tle poruszały się ruchem spójnym w górę, kropki w obrębie figur poruszały się ruchem losowym. **B.** Kierunek. Kropki w tle poruszały się w lewą stronę, kropki w obrębie figur poruszały się w górę. **C.** Prędkość. Prezentowane były trzy opcje, złożone z różnych prędkości: kropki w tle poruszały się w górę z prędkością: 20 stopni na sekundę, a kropki w obrębie figur prędkością 10 stopni na sekundę lub: 10 stopni na sekundę (tło) versus 5 stopni na sekundę (figury) lub 2 stopnie na sekundę (tło) versus 1 stopień na sekundę (figury). Po lewej stronie zaprezentowane są zadania w kontraście negatywnym, po prawej- w kontraście pozytywnym.

Średnica koła S+ wynosiła 100 pikseli (2.88 stopnia). Odległość pomiędzy środkiem S+ i środkiem S- wynosiła 220 pikseli (6.34 stopni). Punkt fiksacji (o średnicy 20 pikseli, 0.58 stopni) był wyświetlany na środku ekranu. Jego kształt został dobrany zgodnie z wytycznymi zaprezentowanymi w pracy Thaler i innych (2012) i stanowił kombinację okręgu z krzyżykiem oraz centralnie umieszczonym punktem (rys. 1). Średnica kropek (zarówno w S+/- i tle) wynosiła 0.115 stopnia, a gęstość kropek była stała w obrębie

wszystkich warstw bodźca i wynosiła 11.386 kropek/sr (3.47kropek/°2). Prędkość kropek była utrzymana na stałym poziomie w obrębie danego zadania.

Bodźce wyświetlane były na monitorze LCD (Iiyama G-Master GE2788HS, przekątna= 27 cali, rozdzielczość 1920 × 1080, szybkość odświeżania 60 Hz). Ekran został podzielony pionowo na dwie części, i każdy z bodźców (S+ i S-) znajdował się po lewej lub prawej stronie. Jasność tła utrzymana była na stałym poziomie na całej powierzchni i wynosiła odpowiednio 0.152 cd/m2 dla ciemnego i 246 cd/m2 dla jasnego tła (pomiar został wykonany fotometrem Tekronix J17). Współczynnik kształtu elipsy w zadaniu bez ruchu, zależał od poprawności odpowiedzi udzielanych przez osoby badane i zmieniał się w granicach wartości od 0,25 do 1, gdzie 1 oznaczało, że elipsa jest kołem. Współczynnik kształtu został zdefiniowany jako stosunek pomiędzy szerokością, a wysokością elipsy.

Trudność zadania zależna była od indywidualnych wyników każdej osoby badanej i zmieniała się, dopasowując się do poziomu wykonania. Po udzieleniu prawidłowej odpowiedzi, współczynnik kształtu zwiększał się, zbliżając elipsę kształtem do koła (trudność zadania wzrastała), natomiast po udzieleniu złej odpowiedzi, współczynnik kształtu malał, a elipsa była łatwiejsza do rozróżnienia od koła. Poziomy progowe postrzegania były obliczane na podstawie średniej wartości współczynnika kształtu z czterech ‘zwrotów’ (ang. *reversal*). Zwrot oznaczał, że za każdym razem, kiedy osoba badana udzieliła błędnej odpowiedzi (wskazując elipsę zamiast koła), trudność zadania zmniejszała się i różnica pomiędzy kołem, a elipsą stawała się wyraźniejsza. Gdy poziom progowy postrzegania był już ustalony, jego wartość była użyta do określenia wysokości elipsy. Różnica pomiędzy wysokością elipsy, a średnicą koła została następnie wyrażona w stopniach kątowych, tak aby umożliwić odniesienie do tradycyjnych miar ostrości (rys. 6).

3.1.3 Procedura badawcza

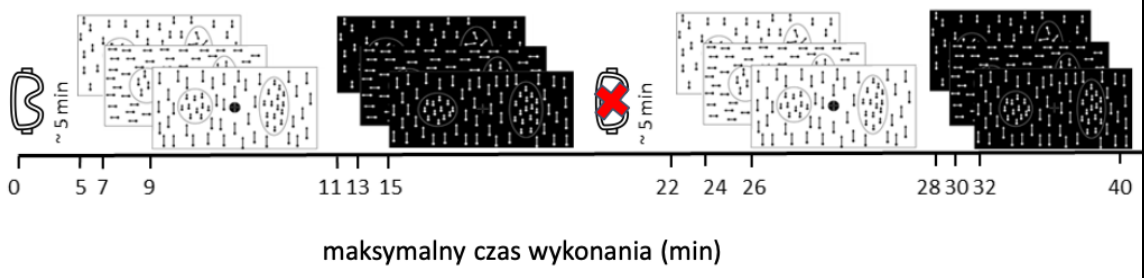
Na początku procedury, wszyscy uczestnicy zostali zaznajomieni z jej przebiegiem i udzielili pisemnej zgody na udział w badaniu. Badanie przeprowadzano w zaciemnionym pomieszczeniu, uczestnicy siedzieli na fotelu w odległości 57 cm od ekranu komputera, na którym wyświetlane były bodźce. W celu zapewnienia stabilnej pozycji, osoby badane korzystały ze specjalnego podbródka. Dzięki temu możliwe było również zminimalizowanie ruchów głowy. Stabilność fiksacji pozostawała pod kontrolą badacza. Dzięki kamerze, która na żywo rejestrowała ruchy gałek ocznych, badacz miał podgląd, wyświetlany na osobnym monitorze. W celu zawężenia pola widzenia w grupie kontrolnej wykorzystaliśmy gogle spawalnicze, które poddane zostały autorskiej przeróbce (rys. 2). Wyposażone one były w wymienne, czarne, nieprzezroczyste szkła. W każdym z nich wykonano dwa otwory o średnicy 1cm. Średnica 1cm odpowiadała 10 stopniom wzrokowym. Otwory te umiejscowione były w odległości pasującej do rozstawu źrenic w grupie kontrolnej (58mm-70mm). W związku z tym wykonano zestaw szkieł, które różniły się tą odległością, a następnie przed rozpoczęciem procedury dobierano indywidualny dla każdej osoby zestaw.



Rysunek 2. Uczestniczka z grupy kontrolnej wykonująca zadanie w goglach ograniczających pole widzenia do 10 stopni wzrokowych. Białe kółka wskazują otwory wykonane w płytce. Wymienne płytki umożliwiały indywidualne dostosowanie odległości między otworami do odległości między źrenicami osób badanych.

Żeby upewnić się, że tak zaprojektowane gogle prawidłowo zawężają pole widzenia, w Samodzielnym Publicznym Klinicznym Szpitalu Okulistycznym (SPKSO) w Warszawie, przeprowadzone zostało badanie pola widzenia, które potwierdziło, indywidualnie dobrany do rozstawu źrenic zestaw zawęża pole widzenia do 10 stopni wzrokowych. U czterech osób z grupy kontrolnej, dodatkową kontrolę fiksacji przeprowadziliśmy z zastosowaniem okulografu (EyeLink 1000, SR Research Ltd., Ontario, Kanada). Odpowiedzi były udzielane za pomocą klawiatury komputera: klawisza lewej strzałki kiedy S+ pojawił się po lewej stronie ekranu i klawisza prawej strzałki kiedy S+ pojawił się po prawej stronie ekranu. Każda próba rozpoczynała się dopiero, gdy osoba badana udzieliła odpowiedzi na poprzednią próbę, w związku z tym całkowity czas reakcji każdej osoby determinował czas prezentacji każdego bodźca w poszczególnej próbie. Osoby badane miały maksymalnie 10

sekund na udzielenie odpowiedzi. Po upływie tego czasu, procedura była kontynuowana, a brak odpowiedzi był raportowany i eliminowany podczas kalkulacji poziomu progowego. W grupie kontrolnej, całość procedury prezentowana była dwukrotnie- najpierw w goglach zawężających pole widzenia, a następnie bez gogli, w pełnym polu widzenia. Wyjściowy poziom trudności dla zadań opartych na ruchu określany był na podstawie prostego, stacjonarnego bodźca. Uczestnicy byli proszeni o rozróżnienie koła od elipsy, identycznie jak w bodźcach opartych na ruchu, z tymże w przypadku bodźca stacjonarnego, kontury wypełnione były jednolitym szarym kolorem i wyświetlane były na jednolitym, jasnym tle (53 cd/m2 *versus* 246 cd/m2). Następnie, w grupie kontrolnej mierzona była odległość między źrenicami, co pozwoliło na dokładne dobranie gogli zawężających pole widzenia. Dalej prezentowane były bodźce oparte na ruchu: w pozytywnym, a następnie w negatywnym kontraście. Cała procedura była powtórzona bez gogli zawężających pole widzenia. Obie grupy pacjentów testowane były wyłącznie bez gogli zawężających, w związku z czym czas trwania procedury był u nich krótszy, średnio o 20 min. Przebieg procedury w czasie zaprezentowany został na poniższym rysunku (rys. 3).



Rysunek 3. Przebieg procedury w czasie dla grupy kontrolnej. Bodźce były początkowo prezentowane uczestnikom w goglach ograniczających pole widzenia, a następnie raz jeszcze- po zdjęciu gogli. Prezentowane były bodźce w kontraście negatywnym, a następnie w kontraście pozytywnym. Czas przebiegu procedury w minutach oznaczony jest na osi X.

3.1.4 Statystyczna analiza danych behawioralnych

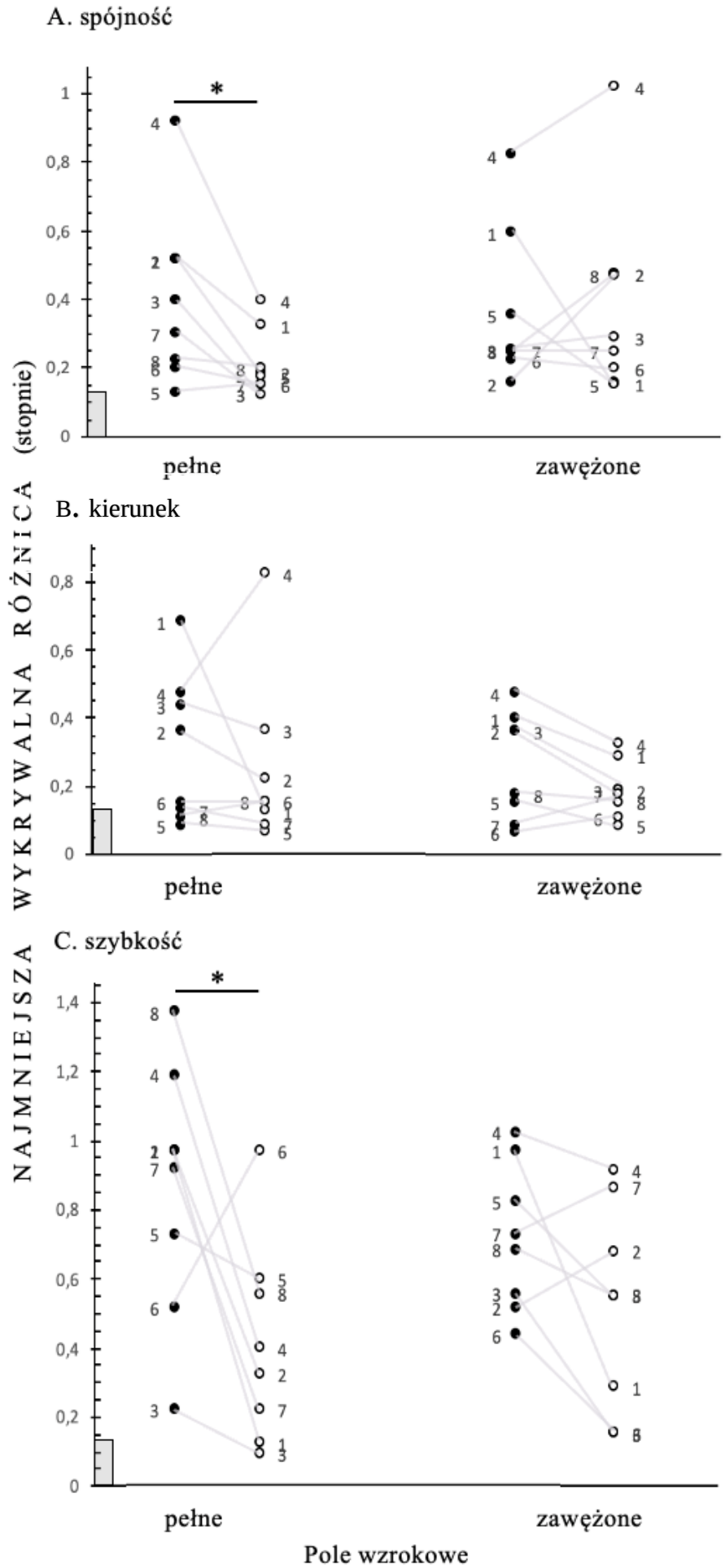
W naszym badaniu, bazując na bodźcach opartych na różnych aspektach ruchu (spójność, kierunek, prędkość) przeprowadzaliśmy pomiar najmniejszej wykrywalnej różnicy pomiędzy elipsą, a kołem.

Analiza statystyczna została wykonana dla wszystkich wyników opartych na bodźcach ruchowych zaprezentowanych w najwyższej prędkości (10/20). W celu przeanalizowania progów punktowych dla ostrości widzenia, wyrażonych w stopniach jako najmniejsza wykrywalna różnica pomiędzy elipsą a kołem, wykonany został test znakowanych rang Wilcoxona. Analiza czasów reakcji została przeanalizowana testem Welch'a. Dla wszystkich testów statystycznych, poziom prawdopodobieństwa przyjęty jako statystycznie istotny wynosił P= 0.05. Wszystkie analizy statystyczne zostały wykonane w programie GraphPad Prism 8.

3.2 Wyniki

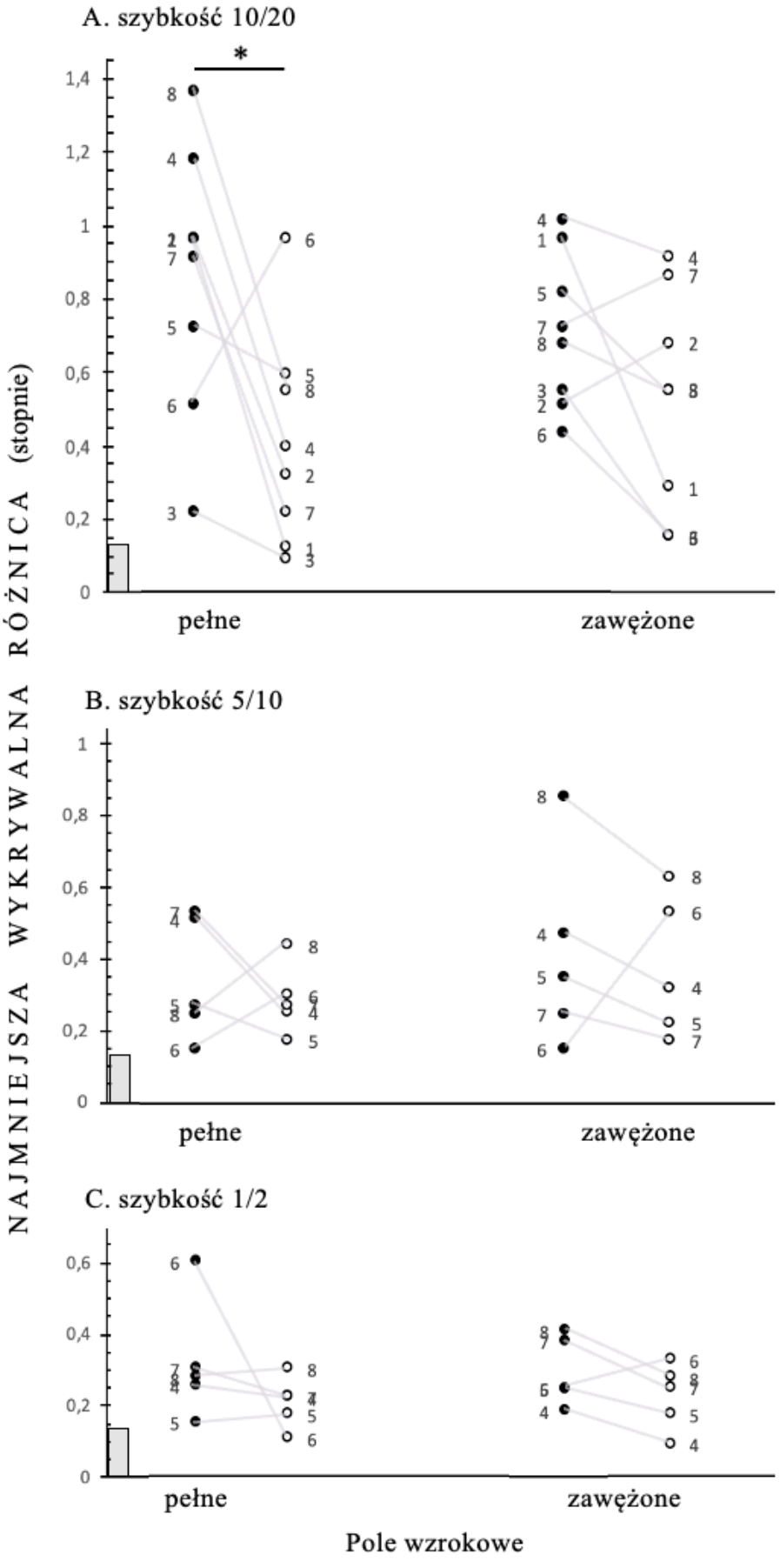
3.2.1 Grupa kontrolna

Analiza indywidualnych wyników w grupie kontrolnej pokazała, że wykonanie zadania opartego na spójności ruchu w negatywnym kontraście różniło się istotnie statystycznie od samego zadania, ale w pozytywnym kontraście (rys. 4A, $P = 0.0234$). Pokazaliśmy też, że zadanie oparte o najszybszy ruch (10/20) prezentowane w negatywnym kontraście jest najbardziej wymagającym ze wszystkich zadań. Jego wyniki były wyższe od tego samego zadania, ale w pozytywnym kontraście (rys. 4B, $P = 0.0391$). Zadanie to było trudniejsze od wszystkich innych zadań: od zadania opartego o spójność ruchu, w pełnym polu widzenia, w pozytywnym ($P = 0.0078$) i negatywnym ($P = 0.0156$) kontraście; w pozytywnym kontraście i pełnym polu widzenia; oraz zawężonym polu widzenia, w pozytywnym ($P = 0.0156$) i negatywnym ($P = 0.0156$) kontraście. Było też trudniejsze od zadania opartego o kierunek, w pełnym polu widzenia, w negatywnym kontraście ($P = 0.0156$), oraz w zawężonym polu widzenia w negatywnym ($P = 0.0156$) jak i pozytywnym ($P < 0.0078$) kontraście.


A. spójność
B. kierunek
C. szybkość
NAJMNIEJSZA WYKRYWALNA RÓŻNICA (stopnie)
*
*
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1,4
1,2
pełne
zawężone
Pole wzrokowe

Rysunek 4. Indywidualne progi minimalnych postrzeganych różnic między wymiarami koła i elipsy w stopniach wzrokowych u osób kontrolnych. **A.** Zadanie ostrości wzroku oparte na spójności ruchu. **B.** Zadanie ostrości wzroku oparte na kierunku ruchu. **C.** zadanie oparte na prędkości 10 stopni/s. Zadania z lewą kolumną danych wykonywano w pełnym polu widzenia, a prawe kolumny danych odpowiadały zadaniom wykonywanym w zawężonym 10-stopniowymi polu widzenia przez gogle. Czarne symbole oznaczają dane o ujemnym kontraście, białe symbole oznaczają dane o dodatnim kontraście, liczby oznaczają uczestników, a szare linie łączą dane osobowe z przeciwnych kontrastów. Szary prostokąt oznacza 0,15 stopnia = 20/60 mierzone za pomocą tablicy literowej Snellena. Gwiazdki oznaczają istotność: * p=0,0234.

W grupie kontrolnej, w zawężonym polu widzenia, te różnice znikają. Dodatkowo przeanalizowaliśmy różnice w wynikach uzyskanych pomiędzy poszczególnymi kontrastami, ale niezależnie od ograniczenia pola widzenia. Ponownie, wyniki uzyskane dla negatywnego kontrastu w zadaniu opartym o prędkość były istotnie wyższe w porównaniu do pozytywnego kontrastu w tym samym zadaniu ($P = 0.0021$), jak i innych zadaniach: opartego o spójność w pozytywnym ($P < 0.0001$) i negatywnym ($P = 0.0001$) kontraście; oraz opartego o kierunek w pozytywnym ($P = 0.001$) i negatywnym ($P < 0.0002$) kontraście.


A. szybkość 10/20
*
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
pełne
zawężone
B. szybkość 5/10
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
pełne
zawężone
C. szybkość 1/2
0,6
0,4
0,2
0
pełne
zawężone
NAJMNIEJSZA WYKRYWALNA RÓŻNICA (stopnie)
Pole wzrokowe

Rysunek 5. Zadania oparte na prędkości u osób kontrolnych. Indywidualne progi minimalnych postrzeganych różnic między wymiarami koła i elipsy w stopniach wizualnych. **A.** zadanie oparte na najszybszej prędkości 10/20 (stopni/s; kształty kontra tło); **B.** zadanie oparte na prędkości, 5/10; i **C.** zadanie oparte na najwolniejszej testowanej prędkości 1/2. Minimalna postrzegana różnica jest wyższa niż w kontraście pozytywnym tylko przy najwyższej testowanej prędkości * p = 0,0391. Nie ma dostępnej analizy statystycznej dla B i C, ponieważ nie byliśmy w stanie wykonać tego zadania na trzech uczestnikach. Zadania z lewą kolumną danych wykonywano w pełnym polu widzenia, a prawe kolumny danych odpowiadały zadaniom wykonywanym w zawężonym 10-stopniowymi polu widzenia przez gogle. Czarne symbole oznaczają dane o ujemnym kontraście, białe symbole oznaczają dane o dodatnim kontraście, liczby oznaczają uczestników, a szare linie łączą dane osobowe z przeciwnych kontrastów. Szary prostokąt oznacza 0,15 stopnia = 20/60 mierzone za pomocą tablicy literowej Snellena.

Analiza czasów reakcji wszystkich zadań w zależności od zawężenia pola widzenia pokazała, że uczestnicy badania odpowiadali najszybciej, gdy pole widzenia było ograniczone do 10 stopni (P = 0.012, t = 2.503, df = 1403.044). W pełnym polu widzenia wszystkie zadania w negatywnym kontraście generowały dłuższy czas reakcji w porównaniu do zadań w pozytywnym kontraście (P = 0.013, t = 2.470, df = 601.230).

Chcieliśmy również sprawdzić, czy osłabienie peryferycznej stymulacji poprzez redukcję prędkości (w zadaniu opartym o prędkość) wpłynie na otrzymane wyniki. W grupie kontrolnej, obniżenie prędkości kropek poskutkowało uzyskaniem niższego progu postrzegania dla różnicy pomiędzy proporcjami S+ i S-.

3.2.2 Pilotażowe wyniki pacjentów z uszkodzeniem siatkówki

Dla pacjentów z RP (n=3), podobnie jak w grupie kontrolnej, negatywny kontrast we wszystkich zadaniach opartych na ruchu okazał się być najtrudniejszym. Co więcej, wykonanie zadania poprawiało się wraz ze spadkiem prędkości. Dla pacjentów, którzy charakteryzowali się największym uszkodzeniem pola widzenia (RP1 i RP2), negatywny kontrast w najszybszej prędkości był najtrudniejszą wersją zadania.

Zadanie oparte na spójności, prezentowane w negatywnym i pozytywnym kontraście były tak samo trudne dla pacjenta RP1, z największą utratą pola widzenia (progi punktowe kolejno dla pacjentów RP1,2,3 dla negatywnego i pozytywnego kontrastu: spójność: 0.86, 0.86; 0.70, 0.80; i 0.83, 0.95; kierunek: 0.84, 0.93; 0.62, 0.87; i 0.95, 0.97; wszystkie wyniki podane w stopniach wzrokowych).

W przypadku pacjentów z chorobą Stargardta (n=2), pomiar przy użyciu zadań prezentowanych w negatywnym kontraście nie był możliwy. Dodatkowo pacjent STGD2 odmówił pracy z bodźcem o najwyższej prędkości (10/20) w pozytywnym kontraście. Wyniki pozostałych zadań przedstawiają się następująco i będą zaprezentowane w kolejności: pacjent STGD 1, STGD2; spójność: 0.29, 0.55; kierunek: 0.36, 0.29; prędkość: 0.9, STGD2 odmówił. Pacjent STGD1, który charakteryzował się największym uszkodzeniem centrum pola widzenia, brał udział w zadaniu o najniższej prędkości, przy czym jej spadek nie poprawił poziomu wykonania, co miało miejsce w przypadku pacjenta STGD2.

3.3 Dyskusja

W przypadku zdrowej grupy kontrolnej pokazaliśmy, że prezentacja szybkiego bodźca w negatywnym kontraście utrudniała różnicowanie bodźców prezentowanych w centralnych 10 stopniach. Było to widoczne zarówno w pełnym jak i w ograniczonym polu widzenia. Wiadomo, że są to cechy bodźca, które silnie aktywizują korowe reprezentacje peryferycznego pola widzenia (Strasburger i in, 2011, Orban i in.,1985). Wynik ten prowadzi do hipotezy, że równoczesna silna aktywacja peryferycznego pola widzenia osłabia centralne widzenie. Wiedząc, że przetwarzanie peryferyczne wzmacnia się wraz ze zwiększeniem prędkości (Orban i in., 1985), zdecydowaliśmy się na jej modyfikację. Również w tej części badania uzyskaliśmy wyniki potwierdzające tę hipotezę- większa prędkość skutkowała gorszym rozróżnieniem kształtu, a mniejsza prędkość poprawą.

Dla porównania, na rysunku 6 pokazujemy metody stosowane do pomiaru ostrości widzenia, przy zastosowaniu bodźców stacjonarnych. Przykładowo, w tablicach ETDRS, w każdym rzędzie znajduje się równa liczba pięciu liter, a ich wielkość w każdym rzędzie zmienia się w sposób logarytmiczny. Pozwala to na precyzyjny pomiar różnic, jakie zachodziły w poziomie wykonania testu dla każdej prezentowanej linii liter, dla każdego badanego pacjenta. Dodatkowo, w przypadku pomiarów podłużnych, gwarantuje to spójność i dokładność podczas analizy wyników w czasie (Shamir i in., 2016).



Rysunek 6. Testy wykorzystywane do pomiarów ostrości widzenia w badaniach okulistycznych. W kolejnych liniach zaprezentowano jedynie fragmenty całych tablic, gdzie kolejne rzędy zawierają coraz to mniejsze znaki (litery, liczby lub symbole). Test Snellena (Snellen, 1962) oraz Test EDTRS (Sloan, 1952) bazują na literach alfabetu łacińskiego, a testy Tumblinga (Allen, 1957) i Landolta na symbolach skierowanych w różną stronę. Testowanie ostrości przy pomocy prążków polega na wskazaniu orientacji prążków, których szerokość zmniejsza się wraz z kolejnymi wyświetleniami.

W zadaniach prezentowanych w ograniczonym do 10 stopni polu widzenia, uczestnicy udzielali odpowiedzi szybciej, na co wskazywała analiza czasu reakcji. Zaskakująco, nie znaleźliśmy istotnych statystycznie różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi w ograniczonym i pełnym polu widzenia w grupie kontrolnej. Może być to spowodowane tym, że przejściowe, sztuczne ograniczenie peryferycznej stymulacji za pomocą gogli nie jest wystarczająco silne by zaburzyć utrwalone w przebiegu rozwoju wzmocnione funkcje przetwarzania centralnego. Jednak nieodwracalne i długotrwałe zaburzenie prowadziło do zmian w równowadze pomiędzy centralnym, a peryferycznym przetwarzaniem. W poprzednich badaniach na modelu zwierzęcym wrodzonej zaćmy zostało pokazane, że dojrzewanie korowej reprezentacji peryferycznej części pola widzenia było opóźnione

(Laskowska-Macios i in., 2015). Opóźnienie to było związane z uszkodzeniem przetwarzania ruchomego bodźca w negatywnym kontraście (sygnał OFF): mierzony w dorosłości poziom wykonania zadania polegającego na wykrywaniu ruchu globalnego pogorszył się (Zapaśnik i Burnat, 2013), z kolei poziom zadania polegającego na wykrywaniu globalnego kształtu pozostawał na tym samym poziomie pomimo deprywacji (Burnat i in., 2002). Co ważne uszkodzennie przetwarzaniem negatywnego, ruchomego sygnału typu OFF, zostało również wykryte na poziomie siatkówki (Burnat i in., 2012).

Wzmocnienie dominacji dla sygnału typu OFF obserwowane było również u pacjentów, w następstwie niedowidzenia (Pons i in., 2019). Ta wiedza jest szczególnie istotna dla przywrócenia komfortu życia pacjentom z zaburzeniami siatkówki, są oni bowiem głównie stymulowani bodźcami z dominacją kontrastu negatywnego, które są powszechnie występującymi w otoczeniu (Starburger i in., 2011; Jancke, 2021; Rahimi-Nasrabadi i in., 2021). Takie sygnały ponadto są związane z silnymi emocjami. Szybkie wykrycie ciemnych sylwetek drapieżników pojawiających się w peryferycznym polu widzenia umożliwia natychmiastową reakcję ucieczki i pozwala na przeżycie. U pacjentów z ograniczonym peryferycznym polem widzenia, jak w przypadku RP, prowadzić to może do przestymulowania czy niepokoju związanego z ciągłym napięciem. Ponadto, pacjenci zmagający się z obniżoną ostrością widzenia mogą tym silniej być zaniepokojeni stymulacją typu OFF, że dominacja tego typu sygnału w naturalnym środowisku może dodatkowo być wzmacniania przez rozmycie obrazu. Potwierdza to nasza obserwacja związana z odmową uczestniczenia pacjentów z chorobą Stargardta, w tej części badania, która polegała na obserwacji bodźców w negatywnym kontraście. Peryferie wzrokowe pacjentów z chorobą Stargardta są nadwrażliwe na szybkie sygnały w negatywnym kontraście, co skutkuje niemożnością podjęcia zadań, które angażują przetwarzanie centralne lub pewne upośledzenie wykonania takich zadań. Mimo tego, zadania w kontraście pozytywnym,

szczególnie te cechujące się niską prędkością były przez nich z powodzeniem wykonywane- wszystkie osoby badane uzyskały lepszy wynik w zadaniach z niską prędkością, co dowodzi, że swoista konkurencja pomiędzy przetwarzaniem peryferycznym, a centralnym pełni istotną funkcję nawet, gdy bodziec znajduje się w stałej, centralnej pozycji. Przetwarzanie ciemnych sygnałów związane są z powstawaniem silnych emocji co może być interpretowane jako ewolucyjna pozostałość po przetwarzaniu ciemnej sylwetki drapieżnika (np. Burnat, 2015). Pacjenci niedowidzący, mogą w codziennym funkcjonowaniu doświadczać nawet większego dyskomfortu związanego z dominacją otoczenia przez ciemny sygnał, ponieważ ich kondycja prowadzić może do wzmocnienia tego sygnału poprzez nieostre widzenie, które w sposób mechaniczny na poziomie oka wzmacnia sygnały wzrokowe o negatywnym kontraście (Jansen i in., 2019). Wiadomo również, że przetwarzanie peryferyczne jest wzmacniane przez zwiększenie rozmiaru i/lub prędkości prezentowanego bodźca (Orban i in., 1986). w przypadku pacjentów z Retinitis Pigmentosa, u których występuje znaczny ubytek pola widzenia, degeneracja fotoreceptorów nie skutkuje całkowitą utratą komórek zwojowych siatkówki w obrębie peryferycznych części siatkówki, sugeruje to, że pozostałe, aktywne komórki nerwowe w tym obrębie stanowić mogą potencjał dla odzyskiwania funkcji wzrokowych.

W przypadku pacjentów z RP lepsze wyniki osiągane w zadaniach opartych o ruch zależały od stopnia utraty peryferiów pola widzenia. Wiadomo, że w przypadku pacjentów z dotkliwym ubytkiem pola widzenia, degeneracja fotoreceptorów nie wiąże się z całkowitą śmiercią komórek zwojowych peryferycznej siatkówki (dane uzyskane postmortem, Humayun i in., 1999), i być może to właśnie te zachowane komórki stanowić mogą źródło przywrócenia funkcji wzrokowej. Przykładowo, poprawa wykonania zadań wzrokowych została pokazana u pacjentów z RP, których okolica dołka środkowego była poddawana mikro impulsacji laserem w jednym tylko oku. Istotnie, poprawa ta była związana

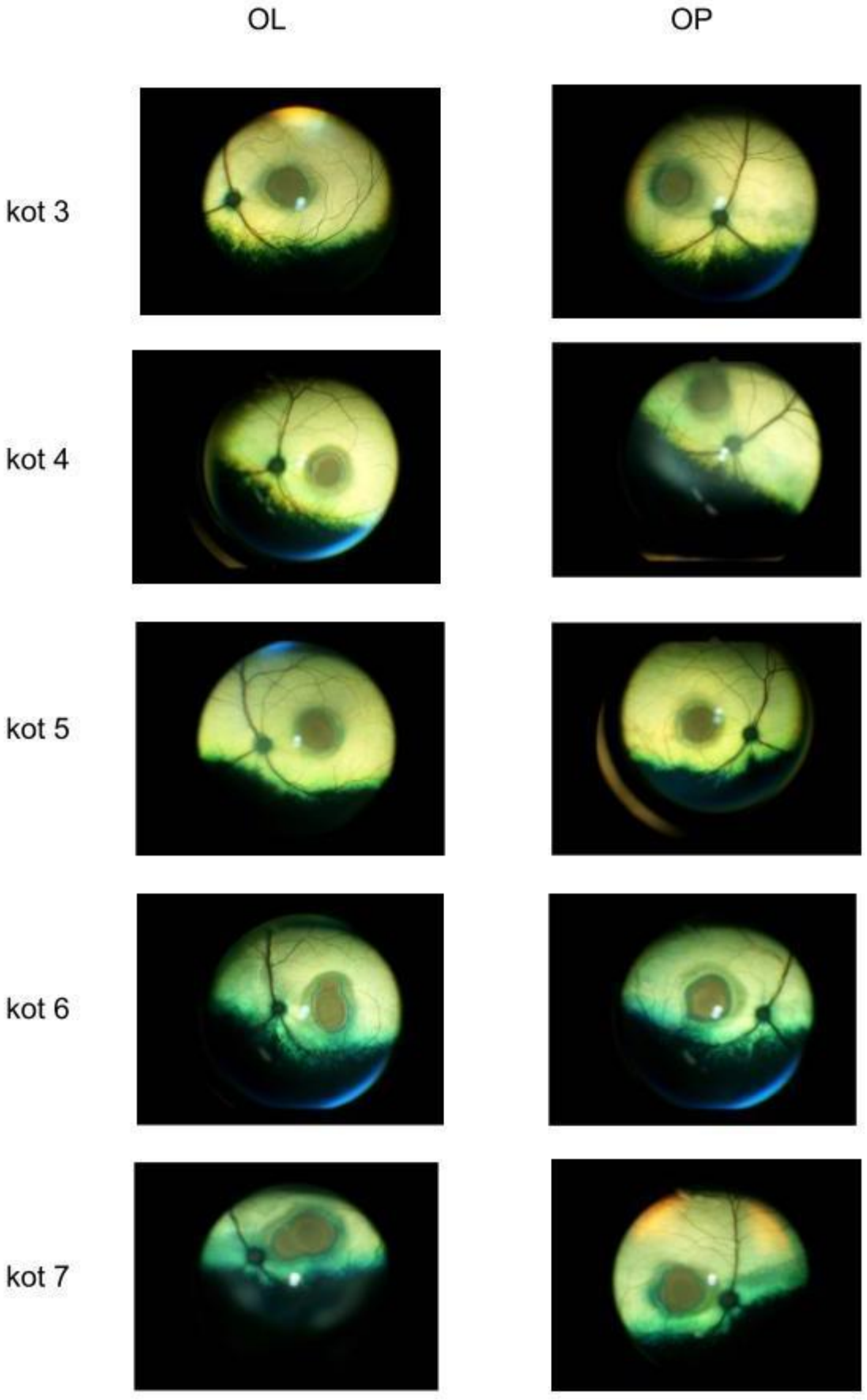
z wynikami elektroretinografii, które były lepsze w okolicach 24 stopni pola widzenia ale nie pobliżu dołka środkowego (Luttrull, 2018). Sugeruje to, że wzrokowe peryferie pozostają plastyczne nawet u pacjentów, którzy mają tunelowe widzenie. Zgodnie z tą obserwacją, dla pacjentów z RP, których poddaliśmy badaniom w naszym eksperymencie, negatywny kontrast był trudniejszy od pozytywnego, co prowadzi do postawienia hipotezy, że korowe reprezentacje peryferycznej siatkówki pozostają funkcjonalne pomimo tego, że są pozbawione wejść z siatkówki, uszkodzonej w przypadku RP. Mogą one ponadto stanowić kluczowy cel w rehabilitacji utraconych funkcji wzrokowych. Uważamy, że zaproponowany w tej pracy zestaw bodźców wzrokowych nie tylko daje potencjalne możliwości pełnej oceny utraty funkcji wzrokowych, ale także pozwoli na wskazanie tych obszarów, które są wciąż aktywne i niosą plastyczny potencjał, stanowiąc możliwy cel rehabilitacji wzrokowych. Wyniki tego badania zostały opublikowane (Kozak i inni., 2021).

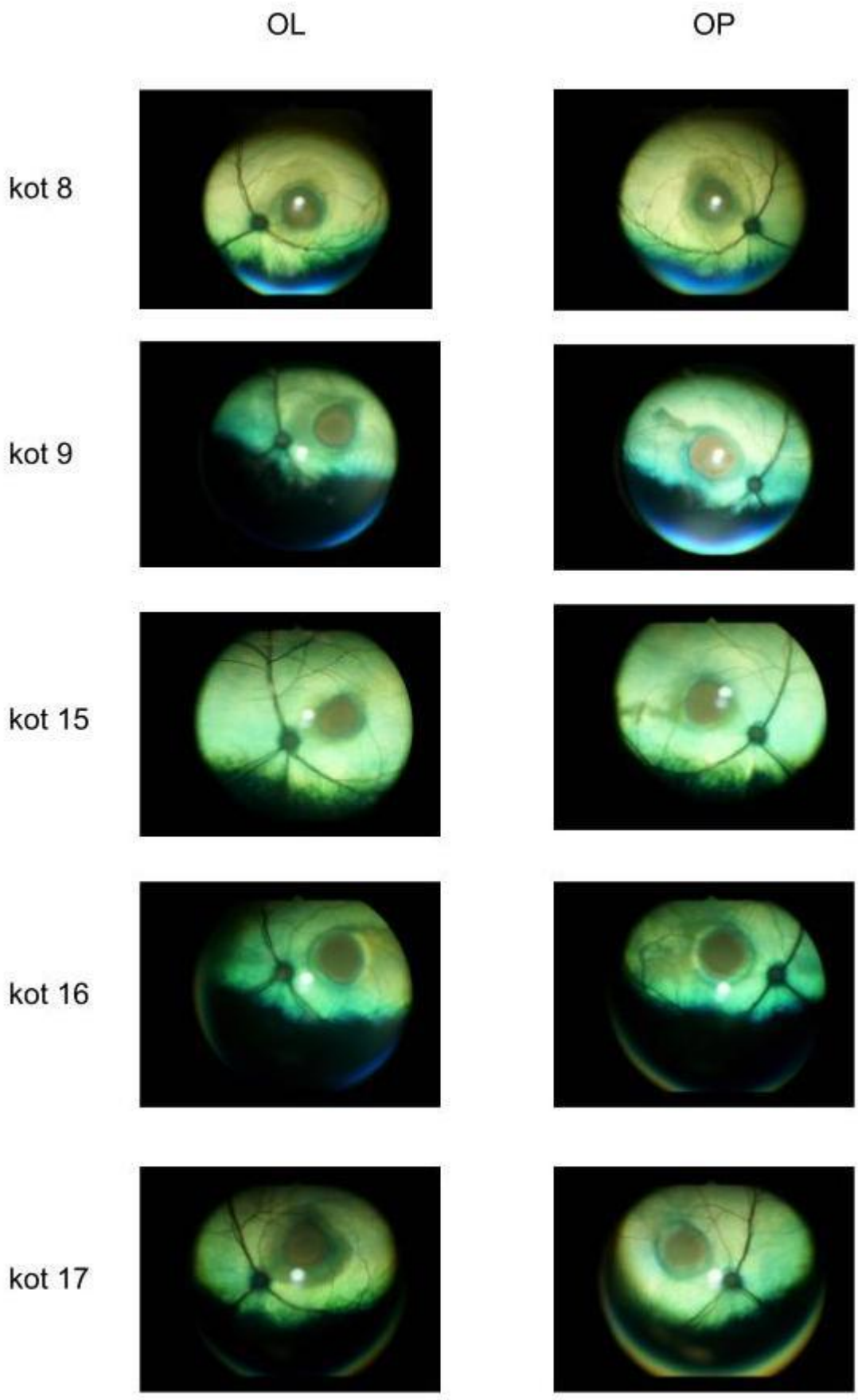
4. Analiza wpływu treningu rozpoczętego bezpośrednio po indukcji uszkodzenia siatkówki, na funkcje wzrokowe

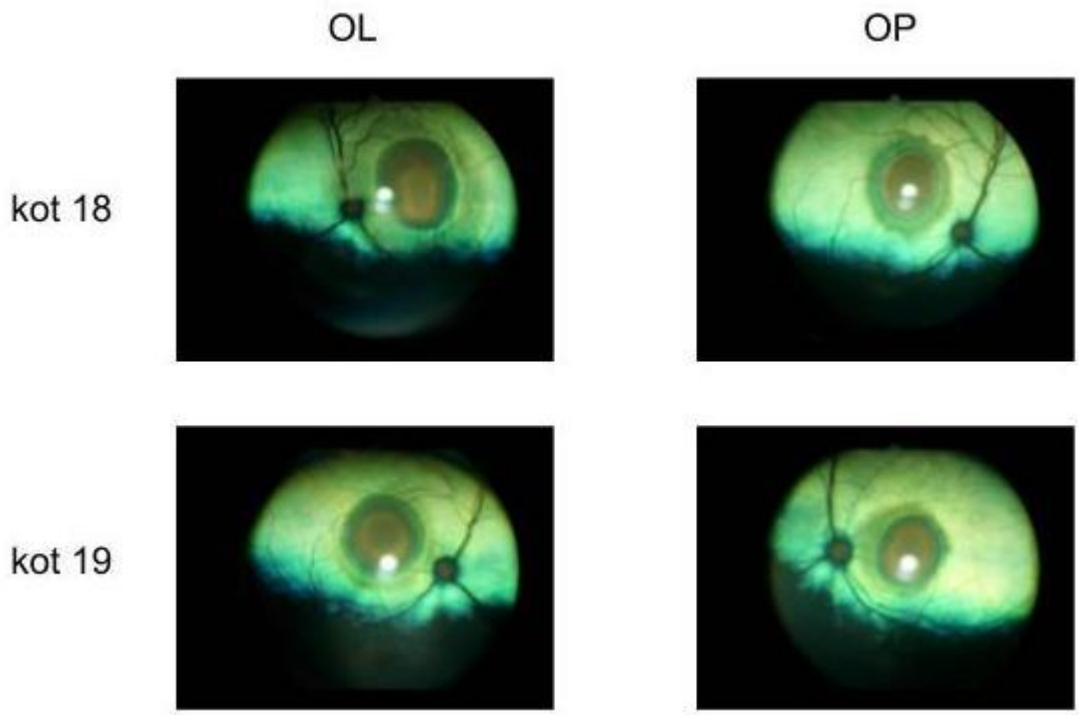
4.1 Metody

4.1.1 Zwierzęta, procedura i lezja

Zwierzęta eksperymentalne (*Felis catus*, n=17, 10 samców, 7 samic) zostały wyhodowane w zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN. Podzielono je na trzy grupy - kontrolne trenowane (CT, n=5); lezyjne trenowane (RLT, n=4); lezyjne nie trenowane (RLN, n=8). Lezje centralnej siatkówki w grupach RLT i RLN zostały wykonane metodą fotokoagulacji (LOG-2 Xenon, Clinitex) w znieczuleniu ogólnym (0.5 ml Ketalar, 0.2 ml Rompun, i.m.) przez Profesora Ulfa Eysela (Ruhr University, Bochum). Chlorowodorek fenylefryny (5%) został użyty w celu schowania trzeciej powieki. Źrenice zostały poszerzone przy pomocy atropiny (1%). Lezje o średnicy 10° pokrywały centrum siatkówki (ang. *area centralis*), co zostało zweryfikowane przy pomocy zdjęcia dna oka, tuż po indukcji lezji (rys. 7). Ta metoda indukcji lezji pozwala na zniszczenie wszystkich warstw komórek siatkówki (Eysel i in., 1981), pozostawiając nienaruszone włókna nerwu wzrokowego jak i komórki zwojowe siatkówki otaczające lezję (Burnat i in., 2017).


OL
OP
kot 3
kot 4
kot 5
kot 6
kot 7

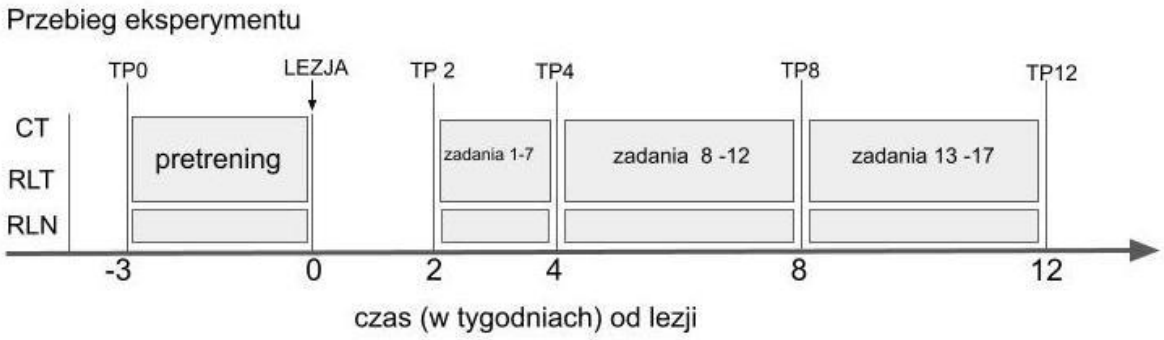

OL
OP
kot 8
kot 9
kot 15
kot 16
kot 17



Rysunek 7. Zdjęcia 10 deg lezji siatkówkowych, wykonane bezpośrednio po zabiegu. Dookoła lezji widoczna jest opuchlizna. Lejza wykonana została w obrębię area centralis, gdzie brak jest naczyń krwionośnych, dzięki czemu możliwe było uniknięcie krwawienia. Prawa kolumna (OL): oko lewe; lewa kolumna (OP): oko prawe. Każdy wiersz przypisany jest do jednego kota (kot 3-19).

Pierwsze, kontrolne obrazowanie MRI zostało wykonane gdy koty miały 8 miesięcy (TP0). Następnie, przez 3 tygodnie, grupy RLT i CT przechodziły procedurę oswajania się z aparatem wykorzystywanym w treningu, co zostało uprzednio opisane przez Zapaśnik i Burnat (2013), i rozpoczęły pretrening, oparty na bodźcach wzrokowych. W tym samym czasie, grupa kotów nie trenowanych - RLN nie była poddawana żadnym procedurom. Drugi skan MRI został wykonany 2 tygodnie po przeprowadzonej lezji siatkówkowej w grupach RLT i RLN (TP 2), wiadomo bowiem, że w tym czasie zachodzi największa odpowiedź komórkowa po indukcji lezji w pierwszorzędowej korze wzrokowej (Arckens, 2006). W okresie rekonwalescencji kotów z lezją, grupa kotów kontrolnych nie była poddawana żadnym procedurom. Po tym czasie, u kotów trenowanych (CT i RLT) rozpoczął się

właściwy trening wzrokowy, a koty nie trenowane przebywały w tym czasie w tych samych klatkach, gdzie miały poprzez codzienną zabawę kontakt z opiekunami. Kolejne skany MRI przeprowadzane były: 4 tygodni po lezji (TP4), 8 tygodni po lezji (TP8) i 12 tygodni po lezji (TP12). W czasie między sesjami skanowania MRI, grupy CT i RLT poddawane były treningowi 5 razy w tygodniu. Wszystkie procedury zostały przeprowadzone zgodnie z European Communities Council Directive of November 24th 1986 (86/609/EEC) i zostały zatwierdzone przez Pierwszą Komisję Etyczną w Warszawie. Przebieg procedury w czasie zaprezentowany jest na rysunku 8.



Rysunek 8. Przebieg eksperymentu w czasie: koty kontrolne (CT), koty po lezji, trenowane (RLT) i koty po lezji, bez treningu (RLN). Sesje skanowania MRI odbywały się w pięciu punktach czasowych (TP). TP0 - pierwsza sesja skanowania MRI przeprowadzona była 3 tygodnie przed lezją (RL, zaznaczona czerwoną strzałką). Następnie, sesje skanowania MRI odbyły się w różnym czasie po lezji: 2 tygodnie (TP2); 4 tygodnie (TP4); 8 tygodni (TP8) i 12 tygodni (TP12). Trening wzrokowy przeprowadzany był pomiędzy sesjami skanowania MRI: między tygodniami 2-4 (zadania 1-7), 4-8 (zadania 8-12) i 8-12 (zadania 13-18). Prezentowane zadania zostały przedstawione w Tabeli 1. Lezja siatkówkowa poprzedzona była 3-tygodniowym pretreningiem w grupie CT i RLT.

4.1.2 Aparat doświadczalny

W przebiegu doświadczenia, zwierzęta trenowane były w automatycznym aparacie podwójnego wyboru, który został skonstruowany według Berkley'a (1979). Zamknięty w aparacie kot widział bodźce pojawiające się na ekranie komputera, przez przezroczyste, wykonane z plexiglasu drzwiczki o wymiarach 8.7 cm x 25 cm. Pomiędzy nimi znajdowała się czarna przesłona, uniemożliwiająca równoczesną obserwację S+ i S-. Pchnięcie głową drzwiczek po stronie odpowiadającej lokalizacji S+ skutkowało automatycznym wydaniem nagrody w formie zmiksowanej karmy. Pchnięcie drzwiczek po stronie S- nie było związane z karą, ale powodowało, że czas przerwy pomiędzy prezentacją bodźców wydłużał się jednorazowo z 0.5 s do 1s.

4.1.3 Procedura treningu

Trening kotów CT i RLT składał się z 17 zadań o wzrastającym stopniu trudności. Ich kolejność została przedstawiona w tabeli 1. W czasie treningu, koty były nagradzane jedzeniem. Waga zwierząt była monitorowana każdego dnia przed oraz po treningu, w celu zapewnienia utrzymania wagi na poziomie 90% przy nieograniczonym dostępie do pożywienia. Dostęp do wody pitnej w wolierach był nieograniczony. Trening przeprowadzany był w aparacie podwójnego wyboru. Podczas trwania treningu koty umieszczone były w aparacie, a bodźce: pozytywny (S+, koło) i negatywny (S-, elipsa) wyświetlane były równocześnie na ekranie monitora, i były widoczne ze środka aparatu doświadczalnego przez przezroczyste drzwiczki z plexiglasu, stanowiących klawisze do udzielania odpowiedzi (szer. 8.7 cm, wys. 25 cm). Pomiędzy drzwiczkami umieszczona była czarna przesłona, która uniemożliwiła jednoczesną obserwację obu bodźców, zapewniając,

że każdy bodziec był widoczny za jednym tylko przezroczystym ekranem. Odległość drzwiczek od ekranu wynosiła 21,5 cm. Bodźce umieszczone były zawsze na ich środku. Naciśnięcie drzwiczek, za którymi wyświetlony był S+ wywoływało podanie nagrody w postaci półpłynnej, zmiksowanej karmy. Naciśnięcie drzwiczek z S- wydłużało czas przed kolejną prezentacją bodźca z 0,5 do 1 sekundy. Poprawienie raz udzielonej odpowiedzi nie było możliwe.

Trudność zadań wzrastała stopniowo, w drodze małych zmian percepcyjnych takich jak dodanie kropek do tła, zmiana kierunku ruchu pomiędzy figurą, a tłem, zmiana prędkości tego ruchu czy spójności ruchu. Dla ułatwienia, wszystkie te zmiany zostały uwidocznione w tabeli (tab.1). Procedura oswajania polegała na przyzwyczajeniu kotów do aparatu i pomieszczenia eksperymentalnego. Każdego dnia, przez około 40 minut, koty przebywały pojedynczo w pomieszczeniu, w którym dostęp do aparatu był im umożliwiony bez ograniczeń. Zwierzęta z zaciekawieniem wchodziły do niego, bawiły się w nim, zdarzało się, że spały, a wszystko to było dla nas sygnałem, że czują się w nim komfortowo. W trakcie procedury oswajania, eksperymentator siedział obok aparatu, jak miało to miejsce później podczas treningu, a następnie włączał aparat w taki sposób by uzyskać charakterystyczny głośny dźwięk związany z podaniem pokarmu przez tłok, do którego koty musiały w czasie tej procedury przywyknąć. Pretrening polegał w pierwszej kolejności na prezentacji bodźca składającego się z koła zbudowanego z białych, spójnie poruszających się w dół z prędkością 40 deg/s kropek (S+), oraz koła zbudowanego z kropek szarych, stacjonarnych, losowo rozmieszczonych (S-). Oba prezentowane były na jednolitym, czarnym tle.

4.1.4 Bodźce wzrokowe

Trening wzrokowy składał się z 17 następujących po sobie zadań zobrazowanych w Tabeli 1. Wiedząc z poprzednich badań (Burnat i in., 2017), że koty, po lezji siatkówki bardzo szybko uczyły się zadań wzrokowych, istotnie szybciej niż koty kontrolne, zdecydowaliśmy się na dwudniowy trening każdego zadania, po którym, niezależnie od uzyskanych wyników, wprowadzono kolejne zadanie. W każdym zadaniu koło (S+) i elipsę (S-) wyświetlano równocześnie po prawej i lewej stronie ekranu. Strona, po której wyświetlane były, wybiera była przez program losowo. Tło, było jednolite w zadaniach (1-2) lub zbudowane z losowo rozmieszczonych kropek: stacjonarnych (3) lub poruszających się (4-16). Każdy z bodźców był prezentowany dwukrotnie: najpierw w pozytywnym kontraście (białe kropki na czarnym tle), a następnie w negatywnym kontraście (czarne kropki na białym tle). Całość badania została przeprowadzona w procedurze podwójnego wyboru, w której możliwe było wybranie jednej prawidłowej odpowiedzi spośród dwóch prezentowanych. W zadaniach 1-7 i 10-12 zastosowano procedurę stałego bodźca (ang. *constant stimuli*) a w 8-9 i 13-17 procedurę stopniowania trudności (ang. *staircase procedure*). W zadaniach 1-7 i 10-12 codzienna sesja składała się 20 prób, na których podstawie obliczany był procent prawidłowych odpowiedzi. Natomiast w zadaniach typu *staircase*, poziom trudności zmieniał się wraz z wykonaniem, indywidualnie dla każdego kota. Następnie obliczany był poziom progowy dla postrzegania: różnicy pomiędzy prędkością kropek w tle i S+/-(8-9); różnicy pomiędzy spójnością ruchu kropek w tle i w S+/- (13-14). Dodatkowo w zadaniach 15-17, procedura ta została wykorzystana w celu obliczenia poziomu progowego dla postrzegania najmniejszej różnicy między proporcją S+ a S-.

Szczegółowy opis bodźców przedstawionych w Tabeli 1, według kolejności treningu (S+ kółko; S- elipsa, RDP, (ang. *random dot pattern*), losowo rozmieszczone kropki, pozytywny kontrast: białe kropki na czarnym tle, negatywny kontrast: czarne kropki na białym tle).

1. Różnicowanie kierunku ruchu, pozytywny kontrast: S+ RDP z kropkami poruszającymi się w dół. S- z kropkami poruszającymi się w górę. Tło czarne bez kropek. Prędkość kropek w S+/- wynosiła 50 deg/s.
2. Różnicowanie kierunku ruchu, negatywny kontrast: S+ RDP, z kropkami poruszającymi się w dół. S- z kropkami poruszającymi się w górę. Tło jasne bez kropek. Prędkość kropek w S+/- wynosiła 50 deg/s.
3. Wprowadzenie RDP do tła: negatywny kontrast: S+ złożony był z RDP, z kropkami poruszającymi się w dół z prędkością 20 deg/s. S- składał się z identycznego RDP. Do tła wprowadzony został RDP, z kropkami stacjonarnymi.
4. Różnicowanie na podstawie różnicy prędkości. negatywny kontrast. Wprowadzenie ruchu do tła. S+/- złożony był z RDP, kropkami poruszającymi się w górę z prędkością 20 deg/s. Do tła wprowadzony został RDP, z kropkami poruszającymi się w górę, z prędkością 2 deg/s.
5. Różnicowanie na podstawie różnicy prędkości. pozytywny kontrast. Zmiana kierunku ruchu i zwiększenie prędkości. S+/- RDP, z kropkami poruszającymi się w dół z prędkością 20 deg/s. Tło składało się z RDP, z kropkami poruszającymi się w dół, z prędkością 50 deg/s.
6. Różnicowanie na podstawie różnicy prędkości. negatywny kontrast. S+/- RDP, z kropkami poruszającymi się w dół z prędkością 50 deg/s. Tło składało się z RDP, z kropkami poruszającymi się w dół, z prędkością 10 deg/s.

7. Różnicowanie na podstawie różnicy prędkości. Zwiększenie prędkości tła. kontrast negatywny. S+/- złożony był z RDP, z kropkami poruszającymi się w dół z prędkością 50 deg/s. Tło składało się z RDP, z kropkami poruszającymi się w dół, z prędkością 25 deg/s.
8. Procedura stopniowania trudności, prędkość kropek tle zmienia się wraz z wykonaniem zadania, kontrast negatywny. S+/- złożony był z RDP, z kropkami w kontraście negatywnym poruszającymi się w dół z prędkością 50 deg/s. Tło składało się z RDP, z kropkami poruszającymi się w dół, z prędkością 10-40 deg/s co zależne było od wykonania zadania.
9. Procedura stopniowania trudności, prędkość kropek tle zmienia się wraz z wykonaniem zadania, kontrast pozytywny. S+/- złożony był z RDP, z kropkami w kontraście pozytywnym poruszającymi się w dół z prędkością 50 deg/s. Tło składało się z RDP, z kropkami w kontraście pozytywnym poruszającymi się w dół, z prędkością 10-40 deg/s co zależne było od wykonania zadania.
10. Różnicowanie na podstawie różnicy kierunku i prędkości, kontrast negatywny. S+/- złożony był z RDP, z kropkami poruszającymi się w dół z prędkością 50 deg/s. Tło składało się z RDP, z kropkami w kontraście negatywnym, poruszającymi się w lewo, z prędkością 10 deg/s.
11. Różnicowanie na podstawie samej różnicy kierunku, kontrast negatywny. S+/- złożony był z RDP, z kropkami poruszającymi się w dół z prędkością 10 deg/s. Tło składało się z RDP, z kropkami w kontraście negatywnym, poruszającymi się w lewo, z prędkością 10 deg/s.
12. Różnicowanie na podstawie samej różnicy kierunku. Odwrócenie kontrastu (z negatywnego na pozytywny). S+/- złożony był z RDP, z kropkami poruszającymi

się w dół z prędkością 10 deg/s. Tło składało się z RDP, z kropkami w kontraście pozytywnym, poruszającymi się w lewo, z prędkością 10 deg/s.

13. Procedura stopniowania trudności, różnicowanie na podstawie różnicy w spójności ruchu, kontrast negatywny. S+/- złożony był z RDP, z kropkami poruszającymi się w dół z prędkością 10 deg/s. Tło składało się z RDP, z kropkami poruszającymi się losowo, w kontraście negatywnym, z prędkością 10 deg/s.
14. Procedura stopniowania trudności, różnicowanie na podstawie różnicy w spójności ruchu. Odwrócenie kontrastu (z negatywnego na pozytywny). S+/- złożony był z RDP, z kropkami, poruszającymi się w dół z prędkością 10 deg/s. Tło składało się z RDP, z kropkami poruszającymi się losowo, w kontraście pozytywnym, z prędkością 10 deg/s.
15. Procedura stopniowania trudności. Testowanie percepcji najmniejszej możliwej różnicy w proporcjach między S+/-, kontrast negatywny. S+/- złożony był RDP o losowym ruchu o stałej prędkości 10 deg/s. Tło składało się RDP z kropkami poruszającymi się ruchem spójnym w dół, ze stałą prędkością 10 deg/s. Stopniowanie trudności polegało na zmianie proporcji S- w taki sposób, że z każdą poprawną odpowiedzią stawał się on bardziej podobny do S+.
16. Procedura stopniowania trudności. Testowanie percepcji najmniejszej możliwej różnicy w proporcjach między S+/-. Odwrócenie kontrastu (z negatywnego na pozytywny). S+/- złożony był z RDP o losowym ruchu o stałej prędkości 10 deg/s. Tło składało się z pozytywnego RDP z kropkami poruszającymi się ruchem spójnym w dół, ze stałą prędkością 10 deg/s. Stopniowanie trudności polegało na zmianie proporcji S- w taki sposób, że z każdą poprawną odpowiedzią stawał się on bardziej podobny do S+.

17. Procedura stopniowania trudności. Testowanie ostrości widzenia przy pomocy percepcji najmniejszej różnicy w proporcjach między S+ a S- w bodźcu stacjonarnym. S+ stanowiło jednolite, szare koło, a S- jednolitą, szarą elipsę. Obie figury wyświetlone były na jednolitym, białym tle. Proporcje S- zmieniały się w sposób analogiczny do zadań 15 i 16.

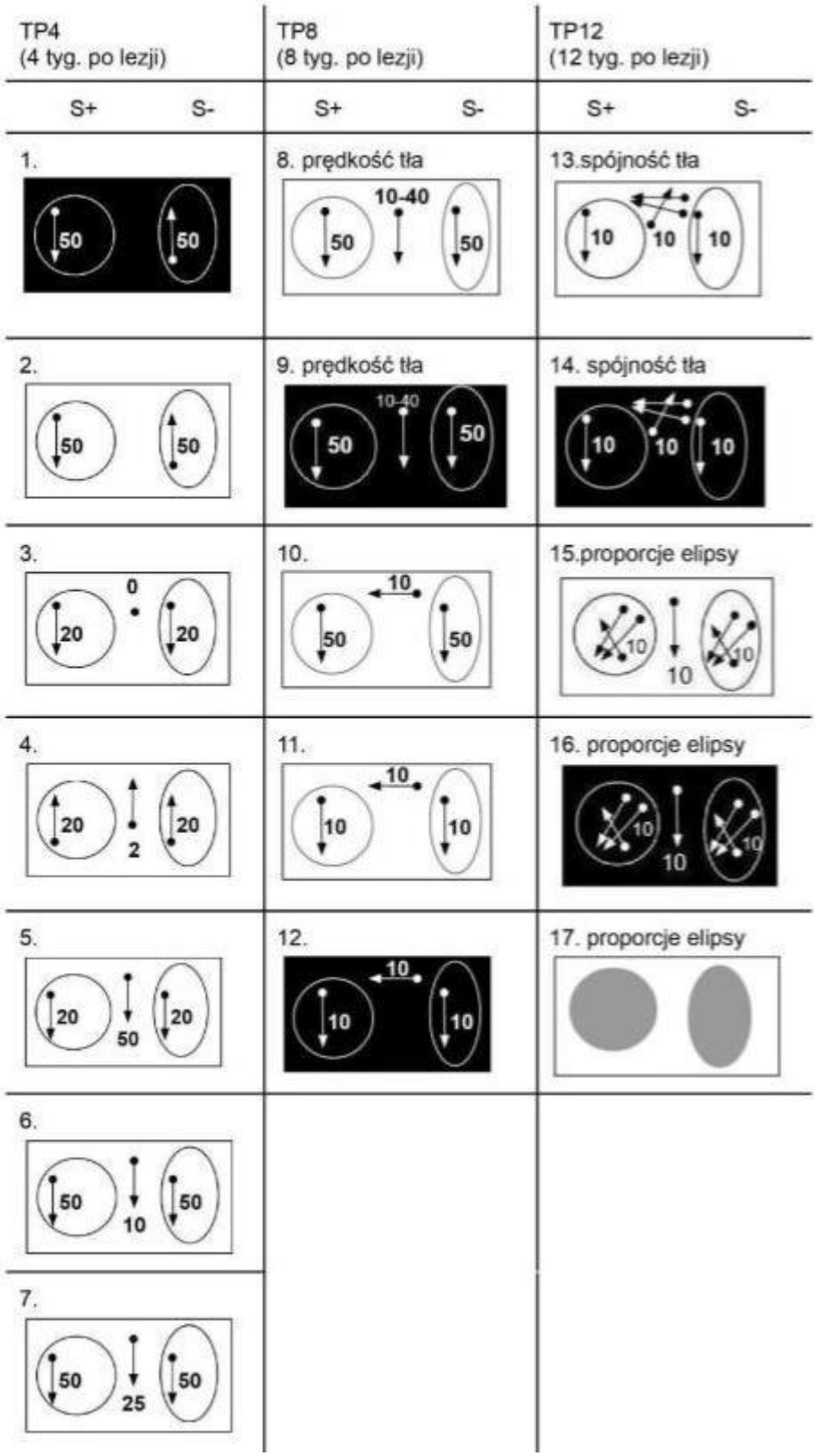


Tabela 1. Schematyczna reprezentacja bodźców wykorzystanych w zadaniu wzrokowym, pokazana zgodnie z kolejnością prezentacji. Każda kolumna zawiera bodźce, które przypisane były do analizy istoty białej w kolejnych punktach czasowych: TP4, 8 i 12. Kierunek strzałek

oznacza kierunek ruchu kropek w obrębie RDK. Numery w obrębie bodźców oznaczają wartość prędkości kropek i podane zostały w stopniach/sekundę. Stały poziom trudności zadania: bodźce 1-7 i 10-12; stopniowanie stopnia trudności w procedurze schodkowej: zadania 8-9 i 13-17.

4.1.5 Akwizycja i obróbka danych MRI

W celu umożliwienia bezpiecznego transportu do skanera MRI na terenie Instytutu Medycyny Doświadczalnej im. Mossakowskiego, którego czas wynosił maksymalnie 10 min., zwierzęta były poddane dożylnej premedykacji i uśpione przy użyciu ketaminy (3-6 mg/kg), butopranolu (0,1-0,5 mg/kg) i deksmedetomidyny (0,03-0,5 mg/kg). Procedura ta odbywała się na terenie Instytutu Nenckiego, w cichym pomieszczeniu przystosowanym do tego typu zabiegów. Przed rozpoczęciem procedury skanowania, drogą wziewną przez maskę, podawany był Izofluran. Podczas protokołu neuroobrazowania monitorowane były funkcje życiowe zwierząt i ich stan ogólny (temperatura i częstotliwość oddechów). W celu utrzymania prawidłowej temperatury ciała, zwierzęta były umieszczone na podgrzewanej ciepłą wodą macie. W celu zminimalizowania artefaktów związanych z niekontrolowanymi ruchami głowy użyto piankowych podkładek stabilizujących. Dane neuroobrazowe zostały zebrane w skanerze MRI (Bruker MRI BioSpec 70/30), o mocy pola magnetycznego 7T, wyposażonym w wykonaną na zamówienie, jednokanałową cewkę odbiorczą o średnicy 55 cm, która była umieszczana bezpośrednio na głowie kota. Była ona przymocowana do przedwzmacniacza, stanowiącego część zestawu firmy BRUKER ("Flexible Surface Coils with dedicated Preamplifier"). Taki układ okazał się być najbardziej efektywnym pod względem uzyskania najlepszego możliwego stosunku sygnału do szumu (ang. *signal to noise ratio*, SNR).

W pierwszej kolejności, w celu weryfikacji poprawnej pozycji głowy kota w skanerze wykonano tzw. skany lokalizacyjne (TriPilot). Następnie uzyskano mapy pola B0, w celu sprawdzenia statycznych niehomogeniczności pola magnetycznego i wprowadzenia ewentualnych korekcji w procesie redukcji niehomogeniczności pola magnetycznego, czyli tzw. "shimmingu". W dalszej kolejności wykonane zostały skany strukturalne T2 TurboRare. Następnie zebrano obrazy dyfuzyjne (ang. *diffusion weighted*, DW) z 81 równomiernie rozłożonymi kierunkami gradientu (b=500s/mm^2), i 3 skanami b=0. Dane DWI zostały zebrane dwukrotnie: w kierunku kodowania fazy anterior-posterior (AP) oraz w kierunku odwróconym- posterior-anterior (PA). Parametry protokołu DWI były następujące: pole obrazowania, FOV (ang. *field of view*) 80x80 mm, czas echa (*echo time*, TE) 35 ms, czas powtórzenia (ang. *repetition time*, TR) 10000 ms, wymiary matrycy akwizycji (ang. *acquisition matrix*) 128x128, wartość (*b-value*) = 500s/mm2, rozmiar woksela: 0.625 x 0.625 x 0.8 mm. Pojedyncza sesja neuroobrazowania trwała ok. 1,5 h.

4.1.6 Przygotowanie danych dyfuzyjnych do analizy opartej na miarach 'fikselowych' (FBA) i tensorze dyfuzji (FA)

Przed wykonaniem analizy FBA, dane zostały przekonwertowane z formatu Bruker ParaVision 5.1 (2dseq) do obrazów NIFTI (.nii), przy pomocy skryptu w programie MATLAB. Ponieważ każdy skan wykonywany był w obu kierunkach kodowania fazy (anterior-posterior AP i posterior-anterior PA, ang. *reverse phase encode spin echo*), co skutkowało otrzymaniem obrazów w dwóch różnych orientacjach, konieczne było ich scalenie w taki sposób, aby zakodowana w nich informacja o kierunkach została zachowana. W tym celu, przy pomocy wbudowanych funkcji programu SPM (https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/) obrazy z kierunkiem kodowania fazy PA zostały

dopasowane do obrazów AP, by uzyskać anatomiczną zgodność. Dalsze etapy pre-processingu, typowe dla analizy FBA, zostały przeprowadzone w programie Mrtrix3 (https://www.mrtrix.org/), i składały się na nie: zmiana formatu danych do kompatybilnego formatu mif (*mrconvert*); weryfikacja tabeli kierunku gradientów (*dwigradcheck*) (protokół obrazowania dyfuzji w rezonansie magnetycznym i dalsze generowanie tensora oraz traktografii wymaga zastosowania tzw. pulsów gradientów w różnych kierunkach, co niesie ze sobą powstawanie tzw. zakłóceń obrazu indukowanych gradientem. W celu ich eliminacji konieczne jest poznanie kierunków gradientów wykorzystanych podczas zbierania danych); usunięcie tzw. szumów zakłócających jakość danych (*denoising*); korekcja artefaktów tzw. pierścieni Gibbsa (*mrdegibbs*); korekcja ruchów (*dwipreproc*). Następnie, dla każdego kota, w oparciu o indywidualne skany DWI, wygenerowane zostały indywidualne, binarne maski (*dwi2mask*). Dalej wykonano korekcję sygnału o niskiej częstotliwości, który powoduje zakłócenia w obrazie (*dwibiascorrect*) oraz normalizację obrazu (*dwiiintensitynorm*). Podczas tej procedury zostały również obliczone mapy FA, a obrazy sprowadzone zostały do wspólnej przestrzeni, którą stanowił szablon będący obrazem uśrednionym ze wszystkich zwierząt. Została również stworzona maska substancji białej i tylko na niej przeprowadzano dalszą analizę. Następnie obliczona została uśredniona funkcja odpowiedzi substancji białej (*dwi2respone*) dla każdego kota jak i średnia dla całej grupy (*avarage_response*). w następnej kolejności dane poddane zostały dwukrotnemu przeskalowaniu (*mrresize*). Oznacza to, że każdy wymiar każdego woksela został powiększony dwa razy w celu lepszego dopasowania danych z mózgów kocich do funkcji programu Mrtrix, który napisany został w oparciu o anatomię mózgu ludzkiego. Dystrybucja kierunków włókien (*fibre orientation distribution*, FOD) metodą ograniczonej dekonwolucji sferycznej (*constrained spherical deconvolution*, CSD) została obliczona indywidualnie dla każdego kota (*dwiextract*). W drodze dwuetapowej normalizacji powstał następnie grupowy szablon,

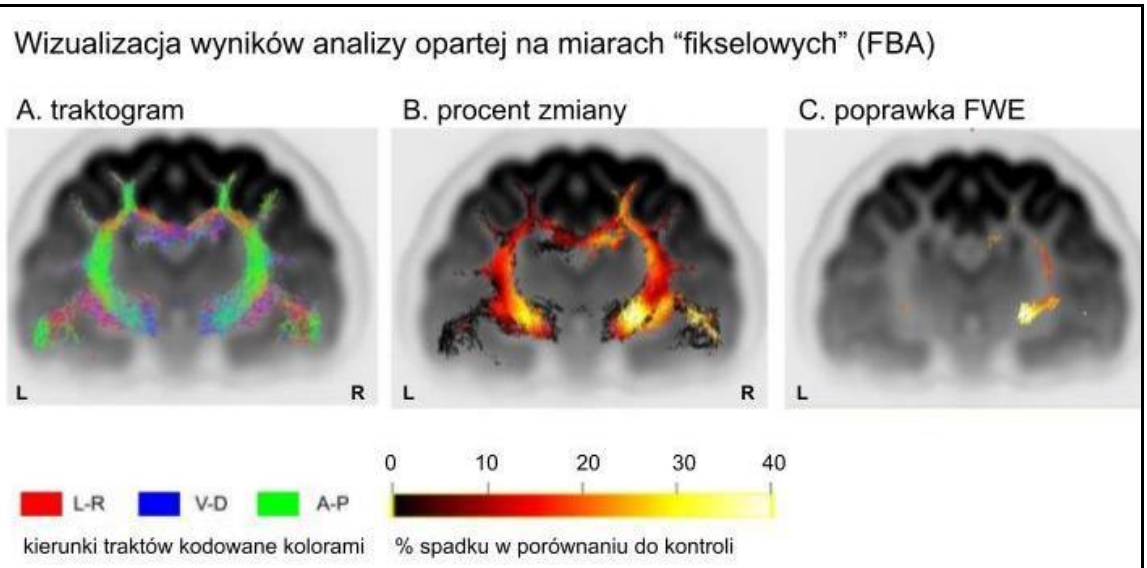
specyficzny dla wszystkich pomiarów DTI, w każdym punkcie czasowym badania. Najpierw został wykonany szablon dla każdego kota, a następnie szablon grupowy. Taka podwójna normalizacja jest szczególnie istotna dla badań podłużnych, w których wykonywane są powtarzalne pomiary. Kolejnym krokiem było stworzenie szablonu maski anatomicznej, będącej najmniejszą możliwą przestrzenią wspólną dla wszystkich zebranych danych. W tym celu, wszystkie indywidualne maski wygenerowane podczas wcześniejszych operacji, zostały sprowadzone do tej wspólnej przestrzeni. Następnie, została wygenerowana maska fikseli, ograniczająca je wyłącznie do substancji białej, definiująca tylko te fiksele, dla których w kolejnych etapach wykonana została analiza statystyczna, prowadząca do uzyskania metryk FBA: (FD - Fiber Density FC- Fiber Cross Section FDC- Fiber Density and Cross Section).

4.1.7 Statystyczna analiza danych

4.1.7.1 Analiza danych dyfuzyjnych oparta na miarach ‘fikselowych’ (FBA)

Analiza statystyczna obrazów została przeprowadzona w programie MRtrix3. W celu identyfikacji obszarów, w których występowały modyfikacje w obrębie gęstości włókien (FD), przekroju wiązki włókien (FC) oraz w obrębie metryki wspólnej dla dwóch poprzednich (FDC), u kotów lezyjnych trenowanych i lezyjnych naiwnych w porównaniu do kotów kontrolnych, w pierwszej kolejności wykonana została analiza fikseli w obrębie całego mózgu (ang. *whole brain*), co pozwoliło na porównanie wszystkich fikseli w obrębie istoty białej pomiędzy grupami. Porównania statystyczne pomiędzy grupami, widoczne FD, FC i FDC, zostały przeprowadzone dla każdego fiksela w obrębie substancji białej za pomocą Ogólnego Modelu Liniowego (ang. *general linear model*, GLM). Wykonane zostały osobne porównania: RLN vs CT i RLT vs CT. Wygładzanie przestrzenne oraz

wnioskowanie statystyczne zostały przeprowadzone w oparciu o metodę CFE (ang. *connectivity based fixel enhancement*). Następnie, wykonywane jest wygładzenie przestrzenne, specyficzne dla poszczególnych traktów (Raffelt i in.; 2015). tzn, że odbywa się ona wzdłuż traktów, a nie w oparciu o model sferyczny, jak w przypadku wielu modeli np. tensorowych. Wartości P z poprawką na wielokrotne powtórzenia (ang. *family-wise error*, FWE) zostały przypisane do każdego analizowanego fixela i poddane nieparametrycznym testom permutacyjnym 5000 razy. Wartości $p<0.05$ uznane były za istotne statystycznie. Fiksele, w obrębie których zidentyfikowane zostały takie wartości były następnie zwizualizowane przy użyciu Mrview, na wspólnym dla całego badania traktogramie (rysunek 9A). Dodatkowo zostały one pokolorowane zgodnie z wielkością efektu, który wyrażony był poprzez procent spadku danej miarym względem grupy kontrolnej (rysunek 9B). w celu dokładniejszego zwizualizowania tych obszarów, w których widoczne były różnice pomiędzy grupami, wyświetlone zostały tylko te trakty, których dotyczyły istotne statystycznie zmiany ($p=0.05$, z poprawką FWE) zmiany (rysunek 9C).

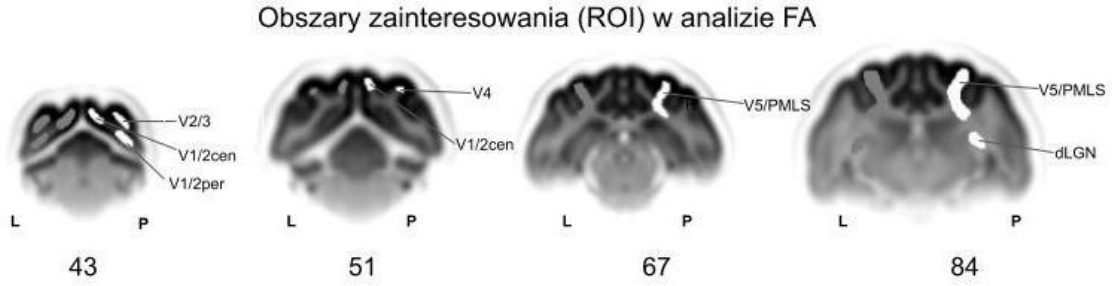


Rysunek 9. Wizualizacja wyników analizy opartej na miarach 'fikselowych' (FBA) zaprezentowane na przykładowych czołowych przekrojach mózgu. **A.** Traktogram wspólny dla całego badania; kierunki włókien zostały zakodowane zgodnie z kolorami: czerwony, lewo-prawo; niebieski, góra-dół; zielony, przód-tył. **B.** Procent spadku w porównaniu do kontroli pokazany został jako gradient koloru od czarnego (0% spadku) do białego (40% spadku). **C.** Traktogram ograniczony do istotnych statystycznie wyników w oparciu o poprawkę dla wielokrotnych porównań, FWE= 0.05.

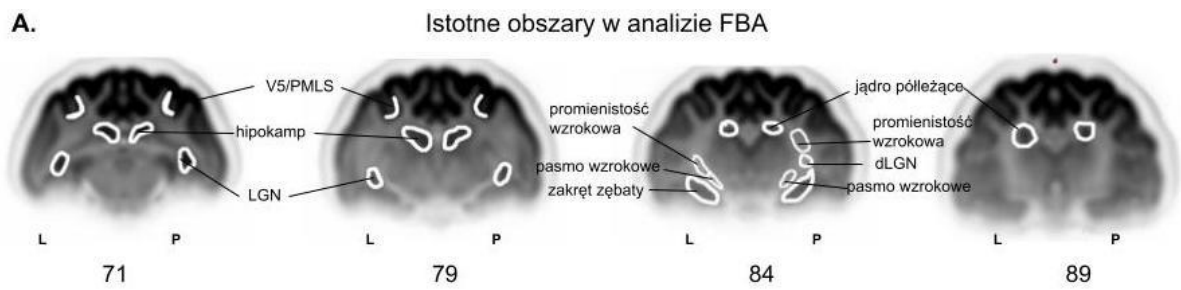
4.1.7.2 Analiza danych dyfuzyjnych oparta na tensorze dyfuzji (FA)

Indywidualne mapy FA zostały poddane analizom w programie SPM. Wykonane zostały porównania średnich wartości FA w obrębie obszarów zainteresowania (ang. *region of interest*, ROI), wybranych na podstawie istotnych wyników analizy FBA. Wykonany został uogólniony model liniowy (GLM) dla wielu czynników z poprawką Bonferroniego. w modelu określono następujące predyktory kategorialne: półkula (prawa vs. lewa), punkty czasowe (0-4), obszary zainteresowania (11) i grupa kotów (3). Analiza modelu wykonana została w programie Statistica (1995-2020 TIBCO Software, Inc.). Wszystkie wyniki bazujące na danych dyfuzyjnych: FBA oraz FA, sprowadzone zostały do wspólnej przestrzeni. ROI wykorzystane w analizie FA (rysunek 10) oraz FBA (rysunek 11) została narysowane i zaprezentowane na dokładnie tym samym szablonie bazującym na całej

populacji badania. ROI zostały wyznaczone ręcznie w programie FSLeyes, w oparciu o anatomiczne korelaty (Burnat i in. 2017). Były to, osobno dla prawej i lewej półkuli: V1/2 centralne (V1/2cen) oraz peryferyczne (V1/2per), drugorzędowa kora wzrokowa (V2/3, V4), V5/PMLS dLGN brzuszny hipokamp i grzbietowy hipokamp.



Rysunek 10. Obszary zainteresowania wykorzystane w analizie FA, wyznaczone zostały w programie FSLeyes, na obrazie dyfuzyjnym, uśrednionym w obrębie całej populacji badania, w oparciu o atlas "Stereotaxic Atlas of the Cat Brain" (Snider, Ray S., Niemer, William T.) oraz szczegółowy opis zawarty w Burnat i in, 2017. Obszary zainteresowania wyznaczono dla prawej i lewej półkuli. V1/2Cen- wejścia do centralnej reprezentacji V1 i V2; V1/2Per- wejścia do peryferycznej reprezentacji V1/2. Numery oznaczają kolejność przekrojów w obrębie szablonu wspólnego dla całej populacji badania.



Rysunek 11. Obszary, w których zaobserwowano procent spadku metryk 'fikselowych', zostały zaznaczone na obrazie dyfuzyjnym, będącym szablonem wspólnym dla całej populacji badania, w oparciu o atlas "Stereotaxic Atlas of the Cat Brain" (Snider, Ray S., Niemer, William T.) oraz szczegółowy opis zawarty w Burnat i in, 2017. Numery oznaczają kolejność przekrojów w obrębie szablonu wspólnego dla całej populacji badania.

4.1.7.3 Analiza danych behawioralnych

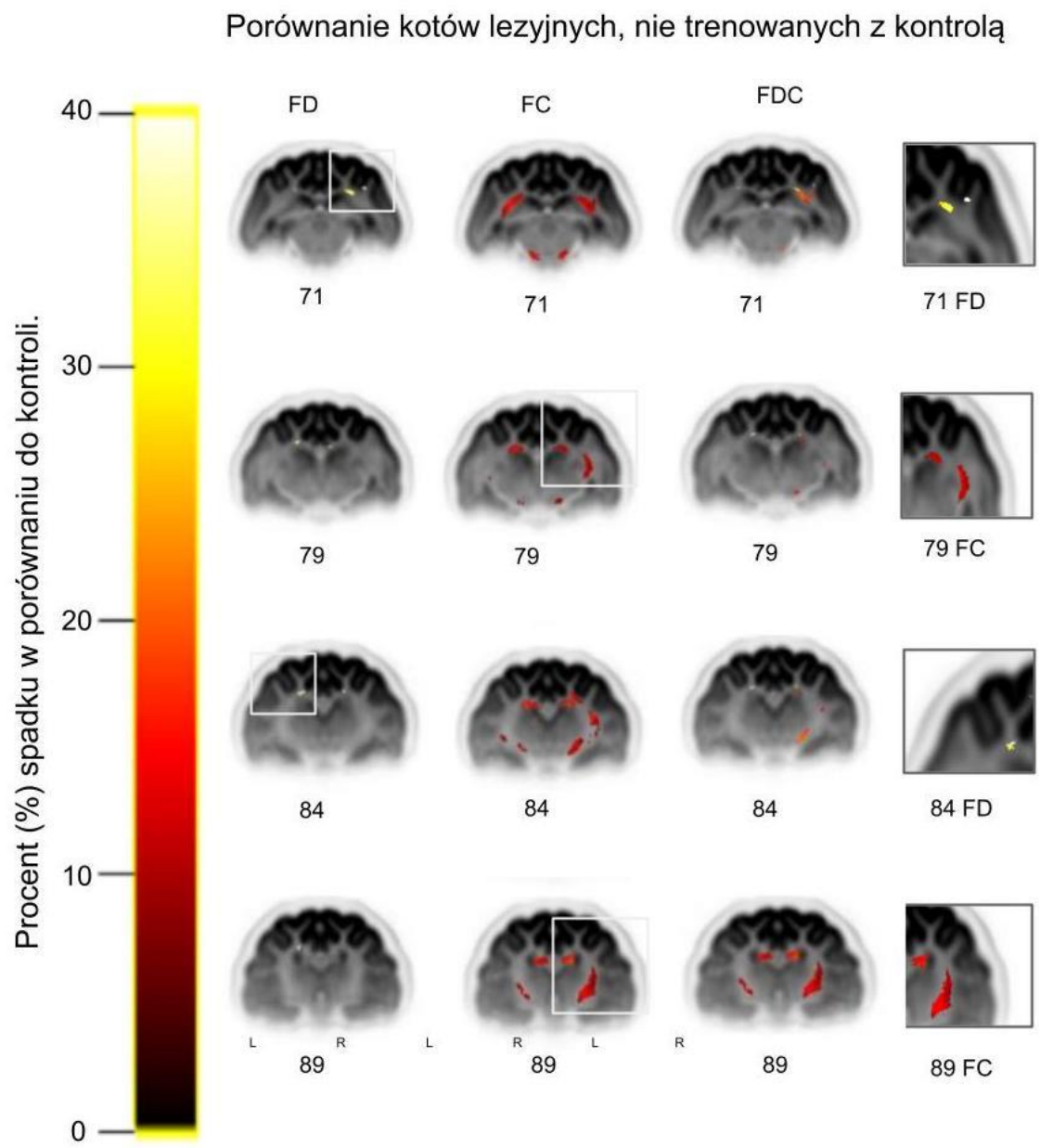
Dla porównania wyników behawioralnych pomiędzy grupami wykonano analizę wariancji ANOVA. Została ona przeprowadzona osobno dla każdego punktu czasowego i każdego pomiaru (zadania). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami w obrębie zadań oraz w zadaniach zostały oznaczone w analizie post hoc Tukeya jako: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$.

4.2 Wyniki

4.2.1 Wyniki analizy danych dyfuzyjnych opartej na miarach “fikselowych” (FBA)

4.2.1.1 Porównanie kotów lezyjnych nie trenowanych z kotami kontrolnymi trenowanymi

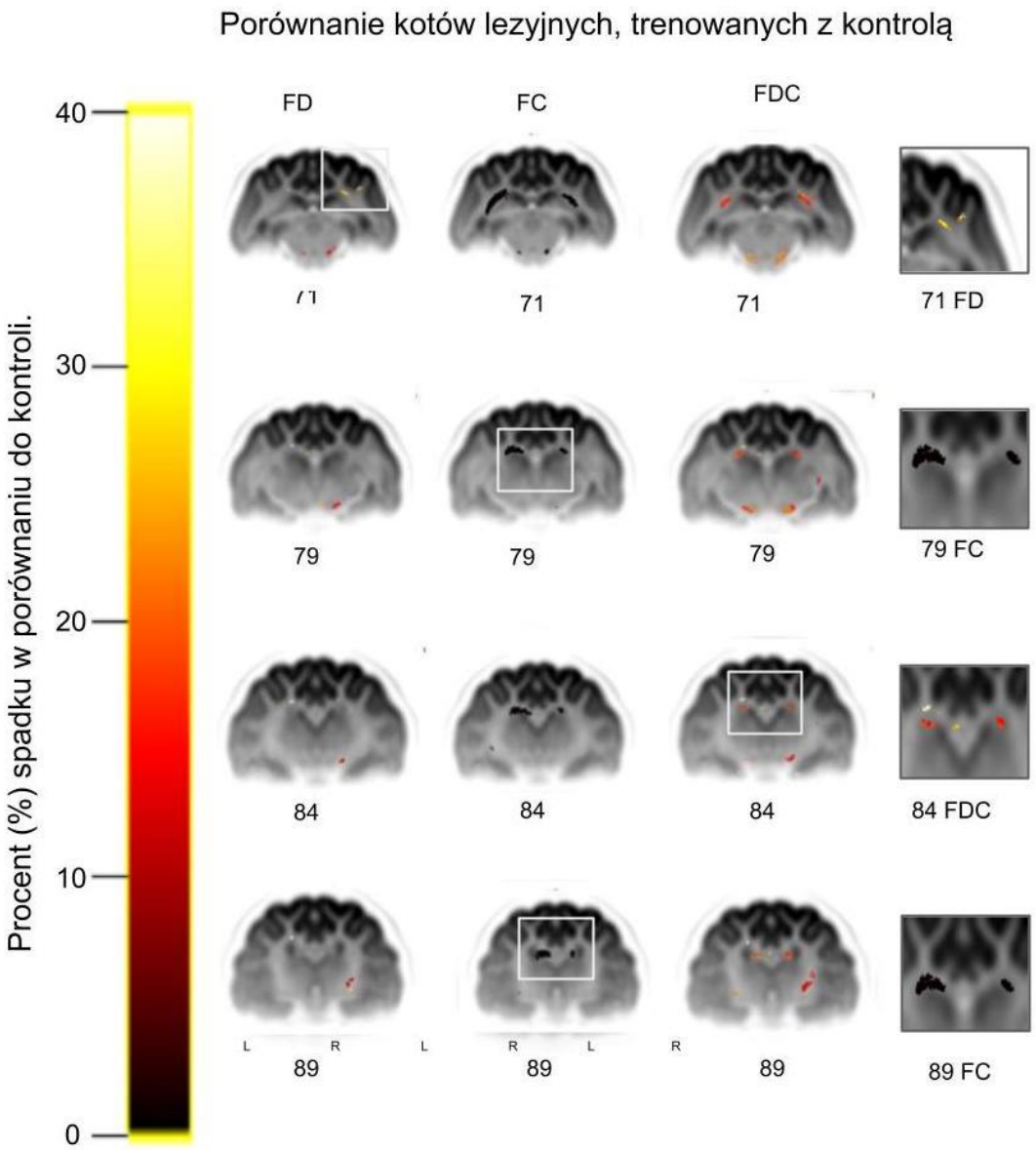
Wyniki analizy danych dyfuzyjnych opartej na miarach fikselowych (FBA) pokazały, że koty lezyjne nie trenowane charakteryzowały się niższymi wartościami w obrębie przekroju przez wiązkę włókien (FC), gęstości włókien w obrębie wiązki (FD) i przekroju przez wiązkę włókien i gęstości włókien w obrębie wiązki (FDC) w porównaniu do kotów kontrolnych trenowanych (rysunek 12). Wartości FD były nawet o 40% niższe u kotów lezyjnych nie trenowanych w porównaniu do kontrolnych trenowanych w V5 i w lewym hipokampie. Te wyniki były jednostronne, o małym obszarze. Wartości FC były do 15% niższe u kotów lezyjnych nie trenowanych w porównaniu do kontrolnych trenowanych obustronnie w dLGN, jądrze ogoniastym (CN) i hipokampie. charakteryzowały się większą szerokością sygnału, ale mniejszym procentem zmiany od wyników FD. Wartości FDC był niższe, nawet do 20%, u kotów lezyjnych nie trenowanych w porównaniu do kontrolnych trenowanych, w prawym dLGN oraz obustronnie w hipokampie i jądrze ogoniastym.



Rysunek 12. Porównanie kotów lezyjnych nie trenowanych z kotami kontrolnymi w obrębie procentowych spadków miar ‘fikselowych’. Istotne obszary zaprezentowane są na czołowych przekrojach, na traktogramie wspólnym dla całej populacji badania i ograniczonym jedynie do istotnych obszarów (FWE, $p<0.05$), w celu zwizualizowania obszarów zaangażowanych w obserwowane zmiany. Kolumny od prawej do lewej: gęstość włókna (FD), przekrój przez wiązkę (FC), gęstość i przekrój przez wiązkę (FDC) oraz powiększenie, w celu lepszego zobrazowania. Białe prostokąty wyznaczają obszary, które zostały powiększone i pokazane w najdalszej, prawej kolumnie. Istotne wyniki zlokalizowano w: V5/PMLS (71 FD), dLGN i hipokamp (79 FC), hipokamp (84 FD) and dLGN and jądro półleżące 89 (FC). Warto zwrócić uwagę na to, że wyniki FD na przekroju nr 71 są jednostronne i silne, nawet do 40% spadku w V5/PMLS.

4.2.1.2 Porównanie kotów lezyjnych trenowanych z kotami kontrolnymi trenowanymi

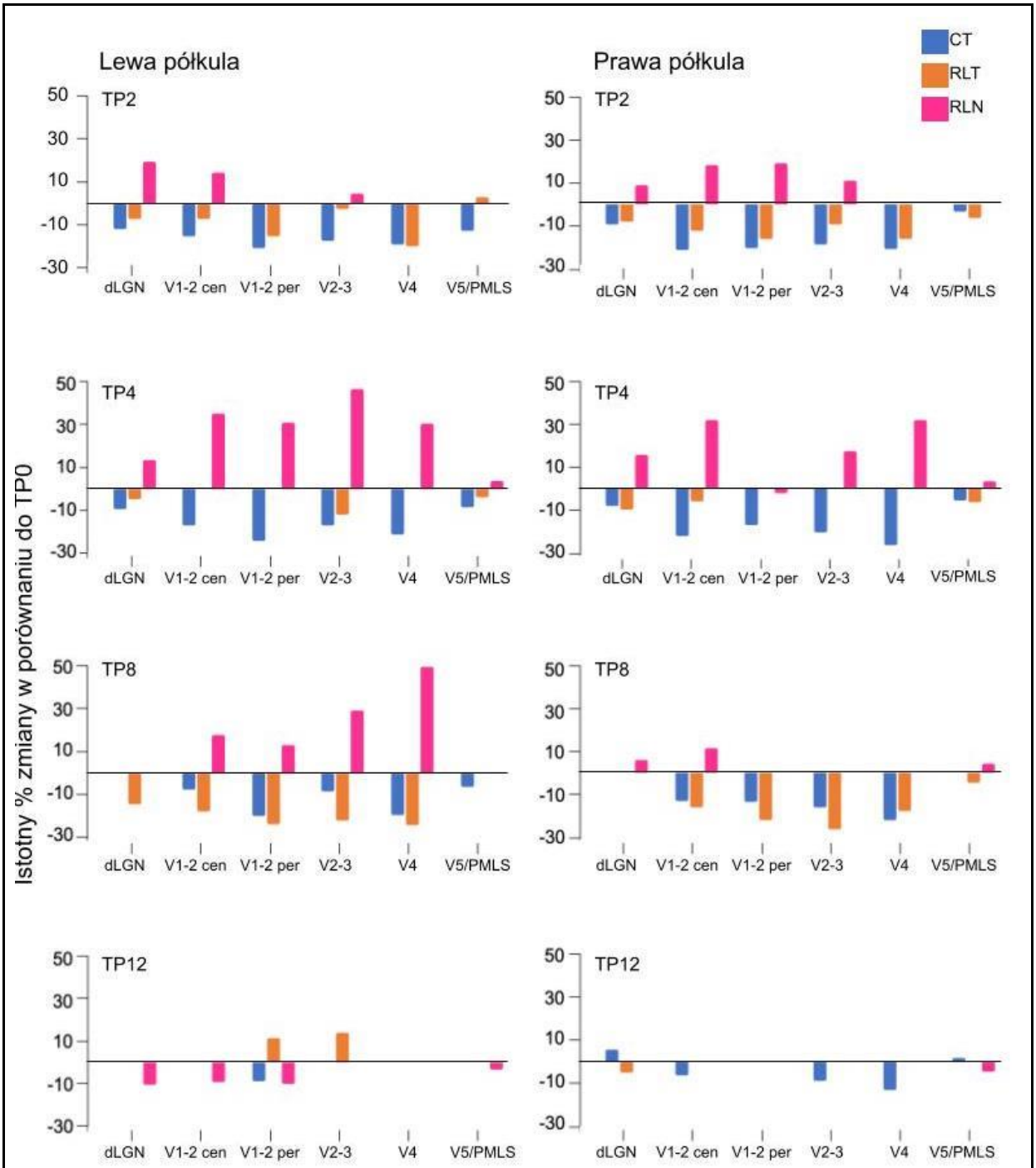
Również porównanie kotów lezyjnych trenowanych z kotami kontrolnymi trenowanymi pokazało, że koty te charakteryzowały się niższymi wartościami FD, FC i FDC w porównaniu do kotów kontrolnych trenowanych (rysunek 13). Wartości FD były u nich do 40% niższe w prawym V5, a wynik ten był zlokalizowany. Wartości FC były niższe (5%) obustronnie w dLGN, jądrze ogoniastym i hipokampie. Wartości FDC były do 20% niższe w grupie kotów lezyjnych trenowanych, a wyniki te były rozległe przestrzennie i obustronne, widoczne w dLGN, hipokampie i jądrze ogoniastym.



Rysunek 13. Porównanie kotów lezyjnych, trenowanych z kotami kontrolnymi w obrębie procentowych spadków miar 'fikselowych'. Istotne obszary zaprezentowane są na osiowych przekrojach, na wspólnym dla całego badania traktogramie, ograniczonym jedynie do istotnych obszarów (FWE, $p<0.05$), w celu zwizualizowania obszarów zaangażowanych w obserwowane zmiany. Kolumny od prawej do lewej: gęstość włókna (FD), przekrój przez wiązkę (FC), gęstość i przekrój przez wiązkę (FDC) oraz powiększenie, w celu lepszego zobrazowania. Białe prostokąty wyznaczają obszary, które zostały powiększone i pokazane w najdalszej, prawej kolumnie. Istotne wyniki zlokalizowano w: V5/PMLS (71 FD), hipokampie (79 FC), jądrze półleżącym (84 FDC, 89 FC). Warto zauważyć, że wyniki FD w obrębie V5/PMLS (przekrój 71) są podobne jak w grupie kotów lezyjnych, nie trenowanych, co widać na rysunku 11 (przekrój 71).

4.2.2 Wyniki analizy danych dyfuzyjnych opartej na tensorze dyfuzji w zdefiniowanych obszarach zainteresowania (ROI)

Sprawdziliśmy, jak przebiega dynamika czasowa zmian wartości FA w różnych odstępach czasowych (cztery, osiem, i dwanaście tygodni po lezji) względem punktu początkowego (TP0, przed wykonaniem lezji i lub rozpoczęciem treningu wzrokowego), oddzielnie dla każdej półkuli każdego punktu czasowego. Rysunek nr 14 pokazuje, osobno dla każdej półkuli oraz każdej grupy kotów, istotną procentową zmianę wartości FA w punktach czasowych od TP2 do TP12, w porównaniu do wartości FA w punkcie czasowym TP0.



Rysunek 14. Istotne zmiany wyników FA po lezji w porównaniu do wyników w punkcie czasowym TP0. Obszary zainteresowań (ROI) zaprezentowane zgodnie z hierarchią wejść wzrokowych: dLGN, ciało kolankowate boczne; V1-2 cen, centralny obszar V1 (obszar 17) i V2 (obszar 18); V1-2 per, peryferyczny obszar V1 (obszar 17) i V2 (obszar 18); V2-3, obszar 18 i 19; V4, obszar 21a i V5, PMLS. Kolory słupków reprezentują grupy kotów: niebieski, koty kontrolne trenowane; pomarańczowy, koty lezyjne i trenowane; różowy, koty lezyjne, nietrenowane. Procent zmiany został obliczony w ogólnym modelu liniowym z poprawką post hoc Bonferroniego,na podstawie wartości uśrednionych, które istotnie różniły się od siebie.

Okazało się, że trzy tygodnie treningu wzrokowego u kotów CT w TP2, prowadziło do znaczących spadków wartości FA we wszystkich analizowanych obszarach, w obu półkulach (Rysunek 14, niebieskie słupki). Wartości te stabilizowały się w TP12 w większości obszarów w lewej półkuli. u kotów z lezyjnych nie trenowanych, indukcja lezji siatkówkowej prowadziła do wzrostu wartości FA (Rysunek 14, różowe słupki). w grupie tej, w obszarach zlokalizowanych w prawej półkuli szybko dochodziło do odpowiedzi na zmiany związane z lezją, a wartości FA szybciej wracały do poziomu początkowego, sprzed indukcji lezji. w punkcie czasowym TP2, tylko w V4 i V5 nie było istotnego wzrostu wartości FA, w obu półkulach. w lewej półkuli spadki FA nie były widoczne w peryferycznych obszarach kory V1-2, dodatkowo 12 tygodni po lezji niektóre obszary wykazywały tendencję spadkową wartości FA w prawej półkuli: centralna i peryferyczna kora wzrokowa V1/2 oraz dLGN. Wrażliwa na ruch kora wzrokowa V5/PMLS wykazywała spadki FA w tym punkcie czasowym w obu półkulach. Co ważne wyniki te pokazują, że gdy przed lezją rozpoczęty jest trening wzrokowy (Rysunek 14, pomarańczowe słupki w TP2), wartości FA spadają podobnie, jak dzieje się to w przypadku kotów CT, a ich poziomy normalizują się w okolicy TP4, by ponownie obniżyć się w TP8 i w końcu powrócić do stanu początkowego w TP12.

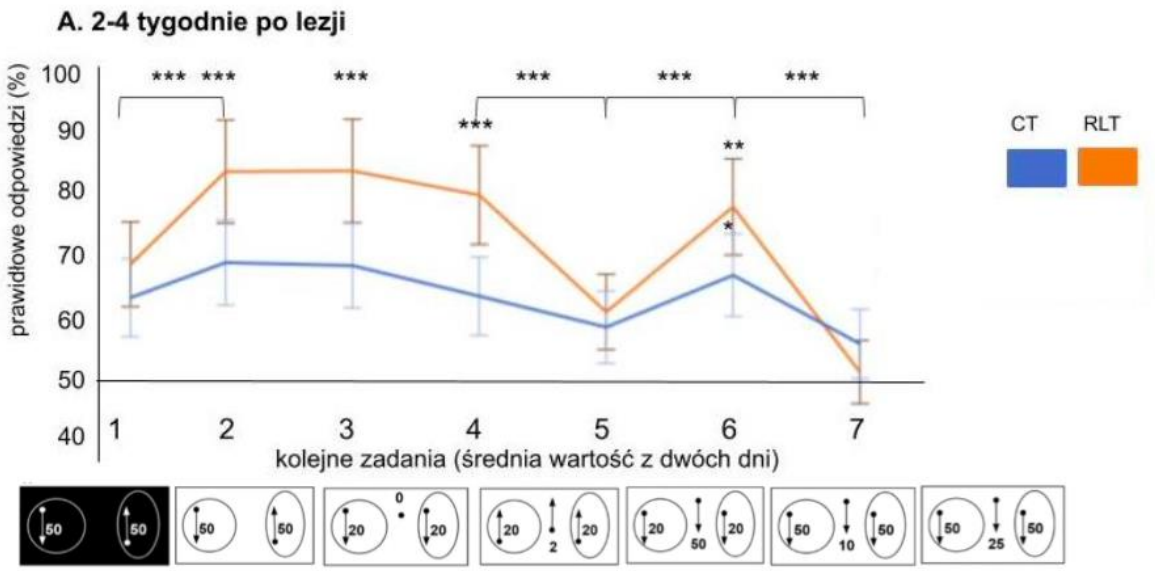
4.3 Wyniki behawioralne

Po przeprowadzeniu pretreningu, wszystkie koty trenowane były zapoznane z prostym zadaniem, w którym S+/- różniły się między sobą kształtem (koło/elipsa) i kierunkiem kropek (w dół/w górę). Tabela 1. stanowi graficzne podsumowanie zmian percepcyjnych w kolejnych zadaniach wzrokowych, które wprowadzane były podczas treningu, w podziale

na punkty czasowe (TP4, TP8, TP12). Wszystkie prezentowane poniżej wyniki były mierzone jako procent poprawnych odpowiedzi.

4.3.1 Cztery tygodnie po lezji

Dla kotów kontrolnych trenowanych, wszystkie prezentowane w ciągu pierwszego miesiąca treningu zmiany w obrębie bodźców były trudne, co odzwierciedlone jest poprzez stałe, słabe wyniki uzyskiwane w tym czasie, co było mierzone procentem poprawnych odpowiedzi (Rysunek 15, niebieska linia). Dla kotów lezyjnych trenowanych większość zmian wprowadzanych w bodźcach okazało się korzystnych co pokazało polepszenie się wyników wraz z ich wprowadzeniem: była to np. zmiana kontrastu z pozytywnego na negatywny (Rysunek 15, pomarańczowa linia, zadanie 1 do 2). Koty te uzyskiwały lepsze wyniki od kotów kontrolnych trenowanych, również po wprowadzeniu stacjonarnych i wolno (2 deg/s) poruszających się kropek do tła bodźca (Rysunek 15, zadania 3 i 4). Wyjątek stanowiły dwie zmiany: zwiększenie prędkości w tle (z 2 do 50 deg/s) i kierunku (z kierunku w górę do kierunku w dół) pogorszyło wyniki kotów lezyjnych trenowanych do poziomu kotów kontrolnych trenowanych (Rysunek 15, zadanie 6, 7).

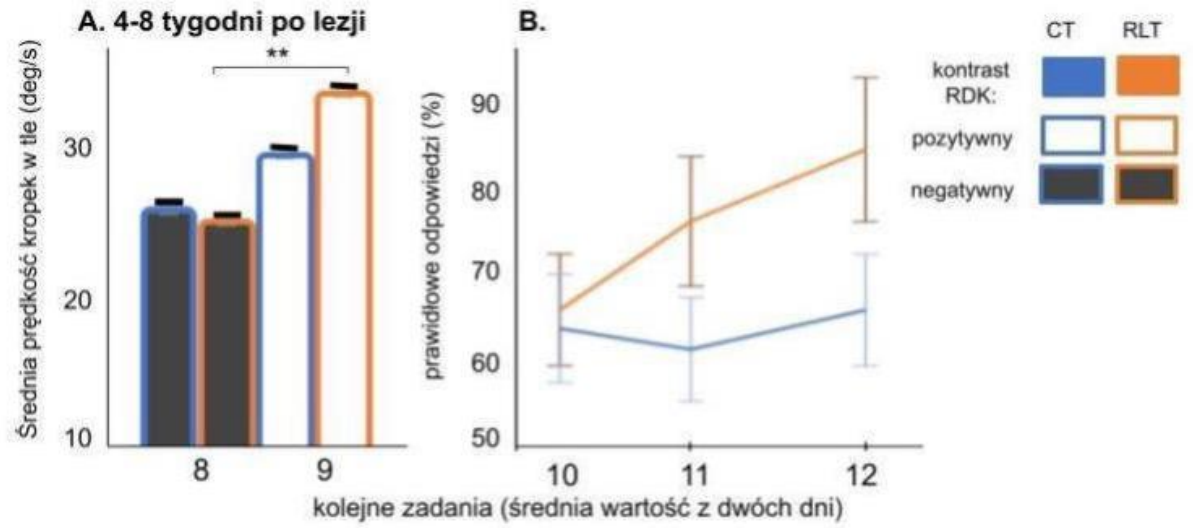


Rysunek 15. Poziom odpowiedzi prawidłowych 2-4 tygodnie po lezji. Wyniki behawioralnekotów trenowanych lezyjnych były lepsze od kotów kontrolnych trenowanych. Kolejne zadania (oś x) prezentowane między 2-4 tygodniem po lezji, różniły się między sobą kontrastem. Stacjonarne RDK w tle zostało wprowadzone w zadaniu 3, i jego prędkość wzrastała - jak w zadaniu 5 i 7. Wykres prezentuje średni procent prawidłowych odpowiedzi wraz z odchyleniem standardowym. Istotne statystycznie różnice zaznaczone są: ** $P \leq 0.01$ i *** $P \leq 0.001$, test post hoc Tukey. Kolory linii oznaczają grupę kotów: niebieski, koty kontrolne trenowane; pomarańczowy, koty lezyjne trenowane. Numery na osi X oznaczają numery zadań, które przedstawiono schematycznie pod numerami, w kolejności prezentacji (zadania 1-7).

4.3.2 Cztery - osiem tygodni po lezji

Wiedząc, że zmiany prędkości wpłynęły znacząco na poziom wykonania zadań przez koty lezyjne trenowane, chcieliśmy dalej sprawdzić wartości progowe dla prędkości kropek w tle, dla pozytywnego i negatywnego kontrastu osobno. Zrobiliśmy to przy użyciu procedury stopniowania trudności, której poziom zmieniał się wraz z wykonaniem zadania. Dla kotów kontrolnych trenowanych oba kontrasty był podobnie trudne, a dla kotów lezyjnych trenowanych, kontrast pozytywny był istotnie łatwiejszy- uzyskiwały one wyższe wartości progowe dla prędkości niż w negatywnym kontraście. W dalszej kolejności chcieliśmy

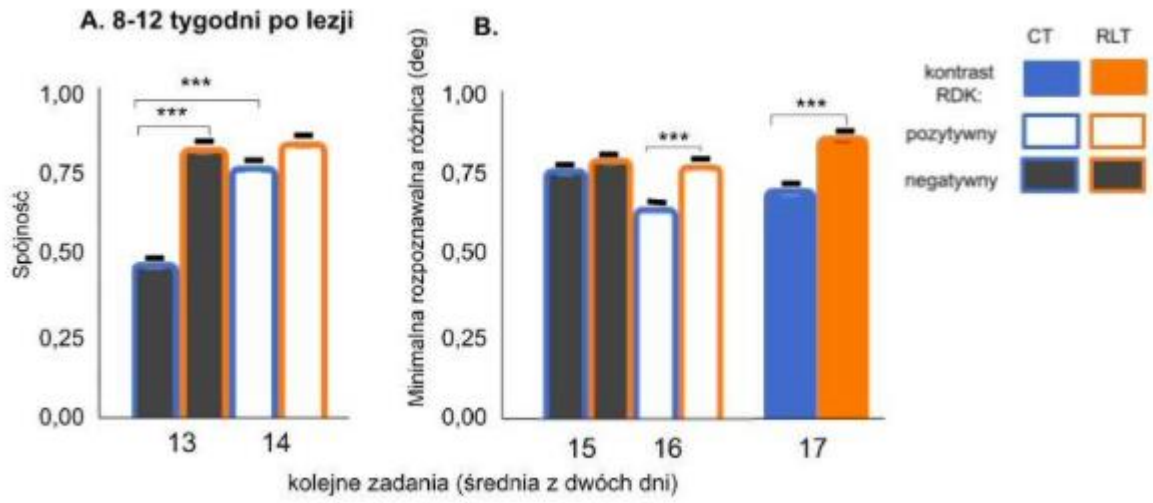
sprawdzić jak kierunek ruchu kropek w obrębie S+/- i tła wpływa na wykonanie zadania. W tym celu, kierunek ruchu kropek w tle został zmieniony na kierunek poziomy. Prędkość kropek w tle została obniżona do 10 deg/s. Zadanie to okazało się być podobnie trudne dla obu grup. Jednak w grupie kotów lezyjnych trenowanych dalsze obniżanie prędkości kropek w obrębie S+/- do 10 deg/s skutkowało istotną poprawą wykonania zadania w obu kontrastach, w porównaniu do kotów kontrolnych trenowanych, których wykonanie zostało na niskim poziomie (Rysunek 16).



Rysunek 16. Poziom odpowiedzi prawidłowych 4-8 tygodni po lezji. A. Prędkość RDK w tle. Zadanie było istotnie łatwiejsze w pozytywnym kontraście niż w negatywnym kontraście w grupie kotów lezyjnych trenowanych. B. Kierunek RDK w tle zmienia się na horyzontalny. Pierwsze zadanie (nr. 10) było tak samo trudne dle obu grup. Wraz ze spadkiem prędkości RDK w tle, koty lezyjne trenowane uzyskały lepsze wyniki od kotów trenowanych kontrolnych (zadania 11 i 12). Istotne statystycznie różnice zaznaczone są: ** $P \leq 0.01$, test post hoc Tukey. Kolory słupków oznaczają kontrast bodźca: ciemnoszary, kontrast negatywny; biały, kontrast pozytywny. Numery na osi X oznaczają numery zadań, które szczegółowo opisano w tabeli 1.

4.3.3 Osiem - dwanaście tygodni po lezji

Sprawdzony został wpływ różnicy w spójności kropek pomiędzy tłem a figurą, co pokazały zadania 13 i 14. Koty kontrolne trenowane osiągnęły istotnie niższe wartości progowe w kontraście negatywnym zarówno w porównaniu do kotów lezyjnych trenowanych jak i swojego wykonania, ale w pozytywnym kontraście (Rysunek 16). W ostatnich zadaniach, zmierzona została ostrość widzenia, w oparciu o percepcję różnicy w kształcie pomiędzy kołem a elipsą. W zadaniu tym, proporcje elipsy zbliżały się do proporcji koła wraz z udzielaniem odpowiedzi, a bodźce składały się z jednolitych figur na gładkim tle. Stacjonarne bodźce były istotnie trudniejsze dla kotów lezyjnych trenowanych niż dla kotów kontrolnych trenowanych (Rysunek 17).



Rysunek 17. Poziom odpowiedzi prawidłowych 8-12 tygodni po lezji. **A**. Spójność RDK w tle. **B.** Ocena ostrości widzenia w oparciu o wykrywanie różnicy pomiędzy kołem a elipsą. Koty lezyjne trenowane osiągały lepsze wyniki od kotów kontrolnych trenowanych w rozróżnianiu jednolitych kształtów prezentowanych na jednolitym tle. Istotne statystycznie różnice zaznaczone są: *** $P \leq 0.001$, test post hoc Tukey. Kolory słupków oznaczają kontrast bodźca: ciemnoszary, kontrast negatywny; biały, kontrast pozytywny. Numery na osi X oznaczają numery zadań, które szczegółowo opisano w tabeli 1.

4.4 Dyskusja

W zwierzęcym modelu utraty centralnego pola widzenia, pokazaliśmy stymulujący efekt treningu aplikowanego po uszkodzeniu centralnej siatkówki. Efekt ten widoczny był jako lepsze wyniki uzyskiwane w treningu behawioralnym przez koty lezyjne, w porównaniu do kotów kontrolnych. Co ważne, pozytywny wpływ treningu był również widoczny w analizie struktury istoty białej mózgu. Wyniki danych dyfuzyjnych oparte na analizie fikselowej wykazały większe spadki w przekroju przez wiązkę włókien u kotów lezyjnych nie trenowanych w porównaniu do kotów kontrolnych trenowanych (do 20%). Zmiana ta, widoczna była w obszarach: dLGN, brzusznym hipokampie, trakcie wzrokowym i jądrze półleżącym. W przypadku porównania kotów lezyjnych trenowanych z kotami kontrolnymi trenowanymi, dla tej samej metryki, różnice były wyraźne w obrębie tych samych okolic, jednak nie były tak silne. Prawdopodobnie ma to związek z hamującym wpływem treningu wzrokowego wobec zachodzących reorganizacji. W przypadku gęstości włókien w obrębie wiązki, procent spadku dla kotów lezyjnych nie trenowanych lezyjnych trenowanych w porównaniu do kotów kontrolnych trenowanych widoczny był w V5 i hipokampie, i spadek był podobnie silny w przypadku obu grup i dochodził do 40%.

W obrębie miary obrazującej jednocześnie przekrój poprzez wiązkę włókien i gęstość włókien w obrębie wiązki (FDC), spadki dotyczyły podobnych okolic dla obu porównywanych grup, i były to: dLGN, brzuszny hipokamp i jądro półleżące. Jednak w przypadku braku treningu, u kotów lezyjnych nie trenowanych, obserwowane zmiany były zlokalizowane w bardziej rozległy sposób, a procent spadku w ich obrębie nie był tak wysoki, jak w przypadku grupy kotów lezyjnych trenowanych. U tych kotów widoczne zmiany charakteryzowały się wyższym procentem, a lokalizacyjnie były bardziej skupione. W przypadku braku treningu, zmiany związane z samą tylko lezją powodowały rozleglejsze

i silniejsze różnice w gęstości włókien w obrębie wiązki i w obrębie metryki obrazującej jednocześnie przekrój poprzez wiązkę włókien i gęstość włókien w obrębie wiązki. W przypadku treningu po lezji, wyraźny był ten sam schemat przestrzenny obserwowanych różnic (były one wyraźne dla tych samych struktur i okolic korowych) jednak schemat przestrzenny był nie tak rozległy, a spadek był niższy. Podobny wzorzec zmian obserwowany był w wynikach FA, gdzie wartości wyraźnie rosły po lezji w grupie kotów lezyjnych nie trenowanych, a dla kotów lezyjnych trenowanych pozostawały zbliżone do poziomu kotów trenowanych.

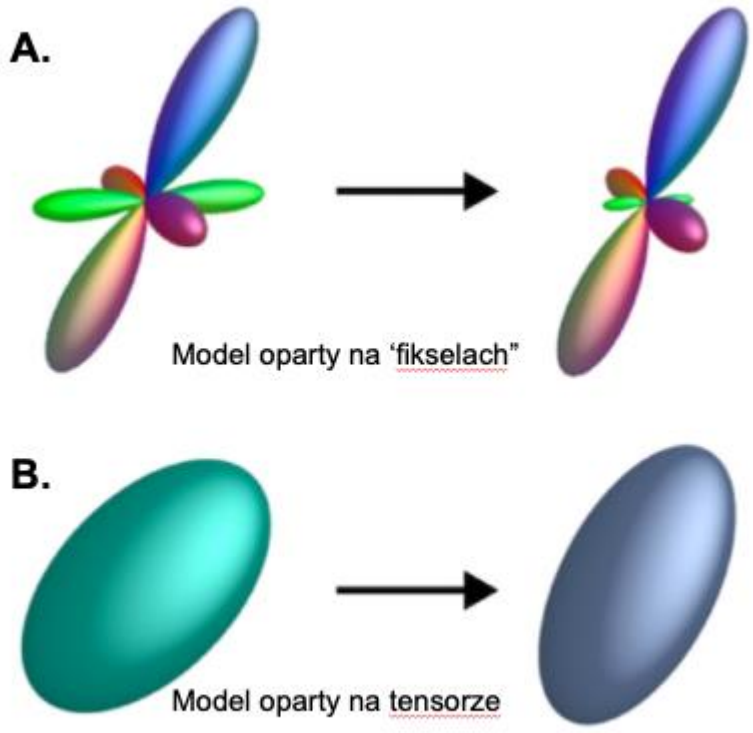
U kotów lezyjnych, trening skutkował bardziej zlokalizowanym i zredukowanym spadkiem metryk uzyskanych za pomocą analizy danych dyfuzyjnych opartych na analizie fikselowej (FBA). Prawdopodobnie trening wzrokowy umożliwia przemodelowanie zachodzących reorganizacji pod wpływem uszkodzeń siatkówki. U pacjentów z MD, najlepiej opisane anatomiczne skutki utraty centralnej siatkówki widoczne były w redukcji gęstości substancji szarej w obrębie wczesnych obszarów wzrokowych (Plank i in., 2011; Sanda i in., 2018; Ge i in., 2021; Brown i in., 2023) i LGN (Hernowo i in., 2014). Jako że nasze pomiary MRI wykonywane były w przeciągu pierwszych 12 tygodni po wykonaniu lezji siatkówkowej, nie znaleźliśmy podobnych istotnych zmian w gęstości substancji szarej.

We wcześniejszym badaniu fMRI u pacjentów z MD, zostało pokazane, że obszary kory wzrokowej, łącznie z V1, które stają się nieaktywne w odpowiedzi na stymulację wzrokowa prezentowaną centralnie, mogą być aktywowane przez bodziec wzrokowy znajdujący się we wzrokowych peryferiach (Baker i in., 2005). Takie wyniki pokazują prawdopodobne modyfikacje układu wzrokowego pacjentów, związane z długotrwałą utratą centralnego widzenia. W modelu zwierzęcym, u kociąt, pokazane zostało również, że korowe obszary wrażliwe na ruch, otrzymujące wejścia z peryferycznej części siatkówki, zachowują silniejsza zdolność do zmian adaptacyjnych i rozwojowych zmian plastycznych

(Laskowska-Macios i in., 2014, 2015). W prezentowanym badaniu, pokazaliśmy, że również u dorosłych kotów, stymulacja wciąż aktywnej, peryferycznej siatkówki skutkowała wzmocnioną percepcją wzrokową, a taki efekt widoczny był w wynikach behawioralnych od 2 do 12 tygodni po lezji siatkówkowej. Lepsze wyniki behawioralne uzyskane przez koty lezyjne prawdopodobnie odzwierciedlają częściowo zachowaną strukturę istoty białej.

4.4.1 Porównanie opisów istoty białej - modele oparte na tensorze dyfuzji

Modele oparte na tensorze dyfuzji nie pozwalają na uzyskanie wyników specyficznych dla włókna. Bazują one na założeniu, że w każdym wokselu znajduje się unikalny kierunek włókien, który reprezentowany jest przez wektor własny. Pomimo rosnącej popularności analizy FBA, modele oparte na tensorze (FA, RD, AD) są wciąż dominującymi spośród wszystkich wykorzystywanych do ilościowej analizy danych dyfuzyjnych (Figley i in., 2022). Rysunek 18 porównuje dwie najpopularniejsze metody analizy struktury istoty białej.



Rysunek 18. Modele wykorzystywane w obrazowaniu substancji białej, pokazane w obrębie pojedynczego woksela: **A.** model oparty na fikselach i **B.** model oparty na tensorze. Rysunek oparty na publikacji Dhollander i in. “Fixel-based Analysis of Diffusion MRI: Methods, Applications, Challenges and Opportunities”, NeuroImage, 2021.

Pierwszy model, oparty na analizie fixeli (FBA, Rys. 18A), umożliwia analizę poszczególnych wiązek włókien poprzez identyfikację każdej z trzech metryk w ich obrębie (FC- fibre cross section- przekrój poprzez włókno, FD-fibre density-gęstość włókien FDC-fibre density and cross section). FC jest miarą makroskopową określającą różnice w przekroju wiązki włókien; FD jako miara mikrostruktury tkanki określa różnicę w gęstości upakowania włókien w wiązce włókien, natomiast FDC określa zmianę zarówno w przekroju wiązki jak i gęstości włókien w jej obrębie. Drugi model, oparty na tensorze dyfuzji (FA, Rys. 18B), nie pokazuje efektów zależnych od kierunku/przebiegu włókien, a bazuje na wartościach uśrednionych w obrębie woksela. Do tej pory większość

nieinwazyjnych metod analizy struktury substancji białej na żywym organizmie stanowiły badania oparte na tensorze dyfuzji, pomimo wyraźnych ich ograniczeń jak np. występujące w modelach opartych na tensorze dyfuzji (FA), porównania uśrednień dla kierunku włókien w obrębie wokseli. Takie wyniki okazywały się być niespecyficzne w obszarach, w których włókna istoty białej krzyżowały się (Dhollander i in., 2021). FA umożliwia pomiar anizotropii dyfuzji w obrębie woksela (czyli zależność od kierunku cząsteczek wody w obrębie istoty białej), lub jako uśrednioną wartość w obrębie zdefiniowanego obszaru zainteresowania. Uzyskane w wyniku tej analizy wartości oscylują pomiędzy 0 a 1, gdzie 0 oznacza dyfuzję taką samą dla wszystkich kierunków, a 1 dyfuzję w jednym, dominującym kierunku. Wartości FA są więc niskie w obrębie istoty szarej i wysokie w obrębie substancji białej. Podążając za tą prostą interpretacją, utożsamianie wysokich wartości FA ze zwiększoną gęstością substancji białej stało się popularnym podejściem. Jednak wysokie wartości FA w substancji białej mogą wynikać z wielu czynników: przepuszczalności błony, średnicy włókna i ich gęstości, mielinizacji, spójności i organizacji włókien (Beaulieu, 2002). Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, interpretacja wyników FA i wnioskowanie o przyczynach i możliwych czynnikach wpływających na dyfuzje wymagają szczególnej ostrożności. Sama tylko analiza kierunku dyfuzji wody, jak w przypadku FA, zawsze może być uzupełniona przez dodatkowe pomiary, również te oparte o model tensorowy (np. RD, uwzględniające dyfuzję w kierunku prostopadłym do ułożenia włókna). W swojej pracy, Orje i in. (2019) pokazali, że największy wzrost wartości FA, 21 dni po umieszczeniu implantu z testosteronem, związany jest z jednoczesnym spadkiem wartości RD w tym samym punkcie czasowym. Uwzględniając powyższe rozważania, nasze wyniki FA staraliśmy się interpretować z należytą ostrożnością.

4.4.2 Wpływ lezji i treningu na istotę białą

4.4.2.1 Środkowe pole skroniowe

Obszarem korowym, dla którego wartości frakcjonowanej anizotropii były najbardziej stabilne w odpowiedzi na lezje siatkówkowe, prawdopodobnie w związku z zastosowanym treningiem, była wrażliwa na ruch okolica korowa V5/PMLS. Ten wynik pozostaje w zgodzie z poprzednimi wynikami, w których obszar V5/PMLS również nie wykazywał spadków aktywności opartej o ekspresję *zif-268*, nawet w obrębie LPZ, inaczej niż w przypadku innych obszarów wzrokowych, jak V1-V4, dla których obserwowano natychmiastowy i długotrwały spadek w *zif268* w obrębie LPZ (Burnat i in., 2017).

Analiza danych dyfuzyjnych oparta na danych ”fikselowych” (FBA) pokazała, że spadki w obrębie gęstości włókien w obrębie wiązki w obszarze V5/PMLS były równie silne dla obu grup lezyjnych: trenowanej i naiwnej, i wynosiły do 40%. Żeby lepiej zrozumieć ten wynik, warto pamiętać, że gęstość włókien w obrębie wiązki jest metryką, która odnosi się do zmian w liczbie aksonów obecnych w obrębie wiązki włókien substancji białej (Tournier i in., 2004; Raffelt i in., 2012). W związku z tym, prezentowane tu spadki w obrębie tej metryki mogą być interpretowane jako redukcja w liczbie aksonów w obrębie wiązek włókien biegnących do obszaru V5/PMLS w konsekwencji lezji siatkówkowej. Co ciekawe, żadna inna metryka uzyskiwana w analizie FBA nie była zmieniona, co oznacza, że przekrój w tych wiązkach włókien nie zmienił się wraz z lezja. Opisana redukcja aksonów w obrębie V5/PMLS jest skutkiem nie ich degradacji, co byłoby również odzwierciedlone zmianami w obrębie przekroju wiązki (FC), ale raczej ich przekierowaniem do pełnienia innych funkcji, co zostało wcześniej opisane u pacjentów niewidomych, gdzie obszar V5/PMLS aktywowany był bodźcem słuchowym (Bola i in., 2017, Saenz i in., 2008). Co istotne, V5/PMLS otrzymuje bezpośrednie wejścia poprzez kompleks poduszki (Ouellette

i Casanova, 2006; Piche i in., 2013), dzięki czemu odpowiedzi neuronów w V5/PMLS pozostają relatywnie niezmienione po lezji w obrębie kory wzrokowej V1 (Spear i Baumann, 1979; Guido i in., 1990).

4.4.2.2 Hipokamp

We wszystkich wynikach analizy danych dyfuzyjnych opartej na miarach "fixelowych", pokazaliśmy istotną, obustronną reorganizację w obrębie istoty białej w grzbietowym hipokampie u kotów po lezji. Ten wynik może mieć związek ze zwiększoną eksploracją przestrzeni w związku z treningiem. Rola hipokampa w przetwarzaniu wzrokowym była opisywana u pacjentów po usunięciu hipokampa (e.g., Lee i in., 2005). Procentowe spadki w obrębie uzyskanych metryk FBA były obserwowane w hipokampie w obu grupach lezyjnych - zarówno trenowanej jak i naiwnej. Prawdopodobnie miało to związek z ograniczoną eksploracją otoczenia w następstwie lezji. W grupie kotów lezyjnych i trenownych, prezentowane spadki (FC i FDC) były ograniczone przestrzennie w porównaniu do kontrolnej trenowanej grupy kotów. Zaproponowany przez nas trening angażował zwierzęta do intensywnej eksploracji wzrokowej. Pomimo tego, że koty lezyjne, zarówno trenowane jak i naiwne, zostały wraz z lezją pozbawione części znajomej przestrzeni, prawdopodobnie pamięć ruchów oczu sprzed lezji została zachowana, a następnie wzmocniona poprzez zastosowany trening, czego skutkiem mogło być obserwowane opóźnienie w redukcji gęstości włókien u kotów lezyjnych trenowanych.

4.4.2.3 Jądro ogoniaste

Uzyskane wyniki pokazały zmiany struktury istoty białej w obrębie jądra ogoniastego, które związane były zarówno z treningiem jak i z lezją. Jądro ogoniaste stanowi część struktury prążkowia, która jest silnie unerwiona przez neurony dopaminergiczne (Oldehinkel, 2022) i jest zaangażowana w motywacyjną kontrolę ruchów sakkadowych gałek ocznych (Kawagoe i in., 2004). Przekrój przez włókno (FC) miał mniejsze procentowe spadki, dodatkowo ograniczone przestrzennie, u kotów lezyjnych trenowanych w porównaniu do kotów lezyjnych naiwnych, wynikające prawdopodobnie z silnej motywacji do eksploracji wzrokowej. Zarówno trening i uczenie wykorzystują podobne mechanizmy, a badania neuroobrazowe na ludziach wskazują na możliwą rolę jądra ogoniastego w różnych formach uczenia związanych tak z treningiem, jak i metodą "prób i błędów" (Cincotta i Seger, 2007), klasyfikacji wzrokowej (Ashby i in., 1988) czy kategoryzowania (Seger, 2010).

Wyraźnie widać, że w grupie kotów RLN obecny jest wzrost wartości FA w czasie a najwyższe wartości widoczne były w 4 tygodniu po lezji. Wartości te wracają do poziomu bazowego w 12 tygodniu po lezji co dotyczy obu półkul. Dodatkowo dla prawej półkuli zależność ta obserwowana jest już wcześniej, w 8 tygodniu po lezji.

W grupie kotów lezyjnych trenowanych, u których zaraz po lezjach rozpoczynał się trening wzrokowy, można zauważyć, sinusoidalne fluktuacje wartości FA w czasie. Wartości te spadają na początku, następnie powracają do poziomu bazowego by ponownie ulec spadkowi w 12 tygodni po lezji. Jedyne obserwowane różnice w wartościach FA w stosunku do wartości bazowych (przed lezją) stanowiły wzrosty wartości FA w lewych wzrokowych obszarach- peryferycznych V1-2 oraz V2-3.

Trening blokuje reorganizacje wywołane lezją siatkówki. Dodatkowo, w obrębie wszystkich grup kotów widać, że lewa półkula na dłużej przejawia plastyczny potencjał w porównaniu

do półkuli prawej, w której z kolei zmiany plastyczne ustają w TP4 (w tym czasie w lewej półkuli zmiany wciąż zachodzą).

Trening wzrokowy przeprowadzony po lezji siatkówkowej wyraźnie zatrzymuje reorganizacje z nią związane, a efekt ten widoczny jest również w wynikach behawioralnych.

4.4.2.4 dLGN i korowe okolice wzrokowe V1-4

Włókna istoty białej dochodzące do ciała kolankowatego bocznego nie wykazywały żadnej zmiany pod wpływem treningu. Jedynie w przypadku grupy kotów lezyjnych nie trenowanych (RLN), substancja biała w obrębie pasma wzrokowego oraz włókna dochodzące do struktury LGN wykazywały zmiany, co pokazane było za pomocą dynamiki czasowej wartości FA jak i poprzez spadki procentowych wartości FC. Ta metryka definiuje zmiany w przekroju włókna na poziomie mikroskopowym w (Raffelt i in., 2017), i może być interpretowana jako degeneracja aferentów dLGN w następstwie lezji siatkówki. Najsilniejszy wzrost wartości FA w dLGN obserwowany był 2 tygodnie po lezji, i wracał do poziomu początkowego 8 tygodni po lezji. Uprzednio, Beakelandt i in. (1994) pokazali występowanie przemodelowania synaptycznego u kotów w obrębie dLGN w następstwie centralnej lezji siatkówki. Czas, w jakim obserwowane były fluktuacje immunoreaktywne dla markera zagęszczenia synaptycznego - synapsyny - przypominają nasze wyniki, pokazują wzrost 3 tygodnie po lezji i wracając do poziomu bazowego w okolicach 7 tygodni po lezji. Równoczesny wzrost immunoreaktywności dla markera formowania nowych synaps GAP-43, od 3-go tygodnia po lezji, uzasadnia występowanie przeorganizowania w obrębie dLGN a także poza nim. Równolegle, liczba komórek nie wskazywała na utratę neuronów w obrębie LPZ dla dLGN po leji (Eysel i Wolhard, 1984). Zmiany w połączeniach synaptycznych prawdopodobnie doprowadziły do przesunięcia pól recepcyjnych dLGNu, począwszy od 4 tygodnia po lezji, a trwające nawet 50 tygodni, co

pokazane zostało elektrofizjologicznie u kotów poddanych lezjom siatkówki (Eysel i in., 1980, Eysel i in., 1981). Czasowe zmiany w dLGN w modelu MP u małp kapucynek, obserwowane w poziomie białka GAP43, GFAP związanego ze wzrostem również odpowiadają dynamikę obserwowaną w naszych wynikach FA: początkowy wzrost i następujący po nim powrót do wartości początkowych 4 tygodnie po lezji (Pereira i in., 2022).

Na poziomie korowym, LPZ w obrębie centralnej części V1-2 uwidoczniło wzrost poziomu FA między 2 a 8 tygodniem, a do 12 tygodnia wartości wróciły do poziomu sprzed lezji. Dynamika taka była już wcześniej opisywana w badaniach neurofizjologicznych i neurochemicznych w obszarze V1 kotów poddanych lezji siatkówki (Arckens i in., 2000, Giannikopoulos i Eysel, 2006, Hu i in., 2011). Nasze wyniki FA dla obszarów V2-4 pokazały, że dla zwierząt lezyjnych, ale nie trenowanych, wartości FA spadają od 4 tygodnia po lezji i wracają do wartości początkowych 8 tygodni po lezji. Podobna, zależna czasowo dynamika ekspresji *zif268* była opisana dla obszarów V2/18, V3/19, V4/21a (Burnat i in., 2017) z obserwowanym początkowym spadkiem bezpośrednio po lezji, a następnie częściowym powrotem do wartości wyjściowych wraz z czasem. Badania te zostały opublikowane Kozak i inni (2024).

5. Podsumowanie i wnioski

Zaprezentowany w tej pracy zestaw zadań opartych o ruch, nie tylko pozwala na dopełnienie badań okulistycznych, ale umożliwia też wskazanie potencjalnie nieuszkodzonych lub nawet wzmocnionych funkcji lokalnie uszkodzonego układu wzrokowego, które w popularnych testach ostrości widzenia pozostają niezauważone. Sugerujemy, że nasze nowatorskie podejście do mierzenia funkcji wzrokowych może być stosowane jako wczesne narzędzie diagnostyczne, nawet w domowych warunkach. Ostatnie badania funkcjonalne mózgu w rezonansie magnetycznym przeprowadzone w naszym zespole pokazały, że zaprojektowany w toku niniejszej pracy doktorskiej autorski test do pomiaru ostrości widzenia zależnej od ruchu, wraz z mechanicznym ograniczeniem widzenia peryferycznego u osób zdrowych (Kozak i in., 2021) umożliwia zobrazowanie oddziaływań pomiędzy centralnym i peryferycznym widzeniem (Ninghetto i in., 2024).

W prezentowanym tutaj badaniu, jego uczestnicy udzielali odpowiedzi istotnie szybciej wtedy, kiedy ich pole widzenia było ograniczone. U zdrowych osób, niezależnie od zakresu stymulowanego pola widzenia, pokazaliśmy również pogorszenie się centralnego postrzegania kształtów definiowanych przez ruch. Wyniki te pogarszały się wraz ze zwiększeniem szybkości ruchu w negatywnym kontraście, a poprawiały się wraz z obniżeniem prędkości. Ku naszemu zaskoczeniu, uzyskiwane wartości progowe u zdrowych osób kontrolnych nie zależały od ograniczenia pola widzenia. Zapewne, stosowane w naszym zespole, przejściowe ograniczenie peryferycznego pola widzenia za pomocą gogli nie jest wystarczające by usunąć dobrze ustanowioną podczas rozwoju dominację wzrokową sprzyjającą centralnemu przetwarzaniu, w przeciwieństwie do długotrwałego uszkodzenia siatkówki, które prowadzi do zmian w równowadze pomiędzy centralnym i peryferycznym przetwarzaniem (Ninghetto i inni, 2024).

W naszym pilotażowym badaniu, u dwóch pacjentów z chorobą Stargardta, pokazaliśmy również, że ruchomy sygnał o negatywnym kontraście jest na tyle trudny, że pacjenci odmawiają udziału w tych zadaniach wzrokowych, w których był on wykorzystany. Uwzględniając fakt, że centralna siatkówka naczelnych zbudowana jest w taki sposób by wzmacniać negatywny sygnał i przetwarzanie sygnałów typu OFF, taka niemożność podjęcia tych zadań przez pacjentów STGD jest zrozumiała (Jin i in., 2008). Pacjenci STGD nie są w stanie wykryć kształtu definiowanego przez ruch w negatywnym kontraście, dlatego, że ich centralna siatkówka uległa degeneracji. Co ważne, w analogicznych zadaniach, ale w jasnym kontraście pacjenci STDG uzyskiwali dobre wyniki. Podobną różnicę w postrzeganiu kontrastów zaobserwowaliśmy w przedstawionych tu wynikach behawioralnych kotów po obustronnej symetrycznej lezji centralnej siatkówki. Ten wynik jest szczególnie istotny dla zapewnienia komfortu pacjentom z zaburzeniami siatkówki, jako że są oni stale stymulowani przez sygnały wzrokowe o negatywnym kontraście dochodzące z otaczającego ich środowiska jako, że negatywny kontrast dominuje w naturalnym obrazach (Ratliff, 2010).

Na podstawie naszych badań zwierzęcego modelu uszkodzenia centralnej siatkówki, można wnioskować, że stymulacja wciąż aktywnej, peryferycznej siatkówki prowadzi do wzmocnienia percepcji wzrokowej, a efekt ten widoczny był w wynikach behawioralnych od 2 do 12 tygodni po lezji siatkówkowej (Kozak i in., 2024). Co ważne, w badaniu podłużnym, pokazaliśmy rolę treningu wzrokowego w hamowaniu reorganizacji w strukturach substancji białej wzrokowych w modelu zwierzęcym nagłego uszkodzenia centralnej siatkówki. Zmiany związane z samym tylko uszkodzeniem siatkówki prowadziły do rozległych i dużych różnic w gęstości włókien w obrębie wiązki (FD) i w obrębie metryki obrazującej jednocześnie przekrój poprzez wiązkę włókien i gęstość włókien w obrębie wiązki (FDC). Co ciekawe, żadna inna metryka uzyskiwana w analizie FBA nie

była zmieniona. Oznacza to, że przekrój w tych wiązkach włókien nie zmienił się wraz z lezją a obserwowana redukcja aksonów w obrębie obszaru PMLS/V5 nie wynika z ich degradacji, a prawdopodobnie z przekierowania ich do innych obszarów. W grupie kotów trenowanych z uszkodzoną siatkówką z kolei, zmiany w strukturze istoty białej były skupione i charakteryzowały się mniejszym spadkiem. Analogiczny wzorzec zmian obserwowany był w wynikach FA: wartości wyraźnie rosły po lezji w grupie kotów lezyjnych nie trenowanych. U kotów lezyjnych trenowanych były zblizone do poziomu kotów trenowanych. Mamy nadzieję, że trening wzrokowy celowany we wciąż aktywne peryferia może ‘zmobilizować’ je do przejęcia funkcji, normalnie zależnych od centralnej siatkówki.

6. Lista cytowanych publikacji

1. Alcaro, A., Huber, R., Panksepp, J. (2007). Functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. *Brain Research Reviews*, 56(2), 283–321.
2. Anderson A.K., Phelps E. A., (2001). Lesions of the human amygdala impair enhanced perception of emotionally salient events. *Nature*.17;411(6835):305-9.
3. Anderson, B. A., Laurent, P. A., & Yantis, S. (2013). Reward predictions bias attentional selection. *Frontiers in Human Neuroscience*, *7*, 262.
4. Arckens, L., Eysel, U. T., Vanderhaeghen, J. J., Orban, G. A., & Vandesande, F. (1998). Effect of sensory deafferentation on the GABAergic circuitry of the adult cat visual system. *Neuroscience*, *83*(2), 381–391.
5. Ashby, F. G., & Gott, R. E. (1988). Decision rules in the perception and categorization of multidimensional stimuli. *Journal of Experimental Psychology. Learning, memory, and cognition*, *14*(1), 33–53.
6. Arsenault J.T., Nelissen K., Jarraya B., Vanduffel W. (2013). Dopaminergic reward signals selectively decrease fMRI activity in primate visual cortex. *Neuron* (77): 1174-1186.
7. Baker C. et al. (2005). Reorganization of visual processing in macular degeneration. *J Neurosci*.19;25(3):614-8.
8. S., Chan V.T., Merzenich M.M. (2001). Cortical remodelling induced by activity of ventral tegmental dopamine neurons. *Nature*. 5;412(6842):79-83.
9. Baekelandt, V., Arckens, L., Annaert, W., Eysel, U. T., Orban, G. A., & Vandesande, F. (1994). Alterations in GAP-43 and synapsin immunoreactivity provide evidence

for synaptic reorganization in adult cat dorsal lateral geniculate nucleus following retinal lesions. *The European Journal of Neuroscience*, *6*(5), 754–765.

10. Baroncelli, L., Sale, A., Viegi, A., Maya Vetencourt, J. F., De Pasquale, R., Baldini, S., & Maffei, L. (2010). Experience-dependent reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Experimental Neurology*, *226*(1), 100–109.
11. Bayer M, Rossi V, Vanlessen N, Grass A, Schacht A, Pourtois G. (2016) 1. *Social Cognitive and Affective Neuroscience* B 12 (1): 146-156.
12. Bergsma DP, van der Wildt G. (2010). Visual training of cerebral blindness patients gradually enlarges the visual field. *British Journal of Ophthalmology*. 94(1):88-96.
13. Berridge C.K (2001). Reward learning: Reinforcement, Incentives, and Expectations. In L. L. M. J. H. Kaas (Ed.), *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin* (pp. 523-541). Elsevier.
14. Binda, P., Kurzawski, J. W., Lunghi, C., Biagi, L., Tosetti, M., & Morrone, M. C. (2018). Response to short-term deprivation of the human adult visual cortex measured with 7T BOLD. *eLife*, *7*, e40014.
15. Bola, Ł., Zimmermann, M., Mostowski, P., Jednoróg, K., Marchewka, A., Rutkowski, P., & Szwed, M. (2017). Task-specific reorganization of the auditory cortex in deaf humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(4), E600–E609.
16. Burnat, K., Vandenbussche, E., & Zernicki, B. (2002). Global motion detection is impaired in cats deprived early of pattern vision. *Behavioural Brain Research*, *134*(1-2), 59–65.
17. Burnat K. (2015). Are visual peripheries forever young? *Neural Plasticity.* 2015:307929.

18. Burnat, K., Hu, T. T., Kossut, M., Eysel, U. T., & Arckens, L. (2017). Plasticity Beyond V1: Reinforcement of Motion Perception upon Binocular Central Retinal Lesions in Adulthood. *The Journal of Neuroscience, 37*(37), 8989–8999.
19. Blake, R., & Bellhorn, R. W. (1978). Visual acuity in cats with central retinal lesions. *Vision Research*, *18*(1), 15–18.
20. Cincotta, C. M., & Seger, C. A. (2007). Dissociation between striatal regions while learning to categorize via feedback and via observation. *Journal of Cognitive Neuroscience*, *19*(2), 249–265.
21. Chelazzi L., Perlato A., Santandrea E., Libera Ch.D. (2013). Rewards teach visual selective attention. *Vision Research.*7(85):58-72.
22. Chung STL (2013). The Glenn A. Fry Award Lecture 2012: Plasticity of the visual system following central vision loss. *Optometry & Vision Science*, 90: 520–529.
23. Das A, Huxlin KR. (2010). New approaches to visual rehabilitation for cortical blindness: outcomes and putative mechanisms. *The Neuroscientist.* 16(4):374-87
24. De Weerd P., Sprague J.M., Raiguel S., Vandenbussche E., Orban G.A. (1993). Effects of Visual Cortex Lesions on Orientation Discrimination of Illusory Contours in the Cat. *European Journal of Neuroscience* 5: 1695-1710.
25. De Weerd P., Sprague J.M., Vandenbussche E., Orban G.A. (1994). Two stages in Visual Texture segregation: a lesion study in the cat. *The Journal of Neuroscience*, 14(3): 929-948.
26. Dietrich U. (2005). Feline glaucomas. *Clinical techniques in small animal practice*, *20*(2), 108–116.
27. Dominguez-Borras, J., Armony, J. L., Maravita, A., Driver, J., and Vuilleumier, P. (2013). Partial recovery of visual extinction by pavlovian conditioning in a patient with hemispatial neglect. *Cortex* 49, 891–898.

28. Dominguez-Borras, J.,Saj A., Amony J.L., Vuillleumier P. (2012) Emotional processing and its impact on unilateral neglect and extinction. *Neuropsychologia*. 50(6):1054-71.
29. Dreher, B., Burke, W., & Calford, M. B. (2001). Cortical plasticity revealed by circumscribed retinal lesions or artificial scotomas. *Progress in Brain Research*, *134*, 217–246.
30. Fiedorowicz, M., Dyda, W., Rejdak, R., & Grieb, P. (2011). Magnetic resonance in studies of glaucoma. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, *17*(10), RA227–RA232.
31. Fletcher, E. L., Jobling, A. I., Vessey, K. A., Luu, C., Guymer, R. H., & Baird, P. N. (2011). Animal models of retinal disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *100*, 211–286.
32. Eysel, U., Gonzalez-Aguilar, F., & Mayer, U. (1980). Changes in the cat's visual system following retinal lesions. A functional reorganization in the mature central nervous system.*Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, *228*(2), 117–133.
33. Eysel, U. T., Schweigart, G., Mittmann, T., Eyding, D., Qu, Y., Vandesande, F., Orban, G., & Arckens, L. (1999). Reorganization in the visual cortex after retinal and cortical damage. *Restorative Neurology and Neuroscience*, *15*(2-3)
34. Gilbert, C. D., & Li, W. (2012). Adult visual cortical plasticity. *Neuron*, *75*(2), 250–264.
35. Gaspar P, Berger B, Febvret A, Vigny A, Henry JP.) Catecholamine innervation of the human cerebral cortex as revealed by comparative immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase. *The Journal of Comperative Neurology*. 279(2):249-71.

36. Giannikopoulos, D. V., & Eysel, U. T. (2006). Dynamics and specificity of cortical map reorganization after retinal lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(28), 10805–10810.

37. Hall H., Sedvall G., Magnusson O, Kopp J., Halldi Ch., Farde L. (1994) Distribution of D_1- and D_2-Dopamine Receptors, and Dopamine and Its Metabolites in the Human Brain. *Neuropsychopharmacology* 11 245-256

38. Hensch, T. K., Fagiolini, M., Mataga, N., Stryker, M. P., Baekkeskov, S., & Kash, S. F. (1998). Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science*, *282*(5393), 1504–1508.

39. Hu, T. T., Laeremans, A., Eysel, U. T., Cnops, L., & Arckens, L. (2009). Analysis of c-fos and zif268 expression reveals time-dependent changes in activity inside and outside the lesion projection zone in adult cat area 17 after retinal lesions. *Cerebral Cortex (1991)*, *19*(12), 2982–2992.

40. Hu, T. T., Van den Bergh, G., Thorrez, L., Heylen, K., Eysel, U. T., & Arckens, L. (2011). Recovery from retinal lesions: molecular plasticity mechanisms in visual cortex far beyond the deprived zone. *Cerebral Cortex*, *21*(12), 2883–2892.

41. Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1963). Receptive fields of cells in striate cortex of very young, visually inexperienced kittens. *Journal of Neurophysiology*, *26*, 994–1002.

42. Hubel, D. H., Wiesel, T. N., & LeVay, S. (1977). Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *278*(961), 377–409.

43. Humayun, M. S., de Juan, E., Jr, Weiland, J. D., Dagnelie, G., Katona, S., Greenberg, R., & Suzuki, S. (1999). Pattern electrical stimulation of the human retina. *Vision Research*, *39*(15), 2569–2576.

44. Hurd L. Y, Suzuki M, Sedvall G. C (2001). D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 22, 127-137.
45. Huxlin K.R., Pasternak T. (2004) Training-induced recovery of visual motion perception after extrastriate cortical damage in the adult cat. *Cerebral Cortex*, 14:81-90.
46. Ichinose, T., & Habib, S. (2022). ON and OFF Signaling Pathways in the Retina and the Visual System. *Frontiers in Ophthalmology*, *2*, 989002.
47. Ishikawa, M., Otaka, M., Huang, Y., Neumann, P. A., Winters, B. D., Grace, A. A., Dong, Y. (2013). Dopamine triggers Heterosynaptic Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, *33*(16), 6759–6765.
48. Jancke D. (2021). Darks and Lights, the 'Yin-Yang' of Vision Depends on Luminance. *Trends in Neurosciences*, *44*(5), 339–341.
49. Kalogeraki, E., Pielecka-Fortuna, J., Hüppe, J. M., & Löwel, S. (2016). Physical Exercise Preserves Adult Visual Plasticity in Mice and Restores it after a Stroke in the Somatosensory Cortex. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *8*, 212.
50. Karni A., Sagi D. (1991). Where practice makes perfect in texture discrimination: evidence for primary visual cortex plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (11), 4966-4970
51. Kasten E. (2010). A computer program for training eccentric reading in persons with central scotoma. *Journal of Visual Impairment and Blindness* 104 (5).
52. Kawagoe, R., Takikawa, Y., & Hikosaka, O. (2004). Reward-predicting activity of dopamine and caudate neurons--a possible mechanism of motivational control of saccadic eye movement. *Journal of Neurophysiology*, *91*(2), 1013–1024.

53. Krubitzer, L. A., & Kaas, J. H. (1990). Cortical connections of MT in four species of primates: areal, modular, and retinotopic patterns. *Visual Neuroscience, 5*(2), 165–204.

54. Keliris, G. A., Shao, Y., Schmid, M. C., Augath, M., Logothetis, N. K., & Smirnakis, S. M. (2022). Macaque Area V2/V3 Reorganization Following Homonymous Retinal Lesions. *Frontiers in Neuroscience, 16*, 757091.

55. Konorski, J. (1948). *Conditioned reflexes and neuron organization.* Cambridge University Press.

56. Kozak A, Wieteska M, Ninghetto M, Szulborski K, Gałecki T, Szaflik J, Burnat K. (2021). Motion-Based Acuity Task: Full Visual Field Measurement of Shape and Motion Perception. *Translational Vision and Science Technology*. 6;10(1):9.

57. Kozak A, Ninghetto M, Wieteska M, Fiedorowicz M, Wełniak-Kamińska M, Kossowski B, Eysel UT, Arckens L, Burnat K. (2024). Visual training after central retinal loss limits structural white matter degradation: an MRI study. *Behavioral Brain and Function*, 20(1):13.

58. Kruger K., Kiefer W., Groh A., Dinse H.R., von Seelen W. (1993). The role of the lateral suprasylvian visual cortex of the cat in object-background interactions: Permanent deficits following lesions. *Experimental Brain Research* 97: 40-60.

59. Laskowska-Macios, K., Nys, J., Hu, T. T., Zapasnik, M., Van der Perren, A., Kossut, M., Burnat, K., & Arckens, L. (2015). Binocular pattern deprivation interferes with the expression of proteins involved in primary visual cortex maturation in the cat. *Molecular Brain, 8*, 48.

60. Lauwers K., Saunders R., Vogels R., Vandenbusshe E., Orban A.G. (2000). Impairment in motion discrimination tasks in unrelated to amount of damage to superior temporal sulcus motion areas. *The Journal of Comparative Neurology* 420:539-557.

61. Lee, A. C., Buckley, M. J., Pegman, S. J., Spiers, H., Scahill, V. L., Gaffan, D., Bussey, T. J., Davies, R. R., Kapur, N., Hodges, J. R., & Graham, K. S. (2005). Specialization in the medial temporal lobe for processing of objects and scenes. *Hippocampus*, *15*(6), 782–797.

62. Lorach, H., Kung, J., Beier, C., Mandel, Y., Dalal, R., Huie, P., Wang, J., Lee, S., Sher, A., Jones, B. W., & Palanker, D. (2015). Development of Animal Models of Local Retinal Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *56*(8), 4644–4652.

63. Liu M.M, Chan, C.C, Tuo, J. (2012) Genetic mechanisms and age-related macular degeneration: common variants, rare variants, copy number variations, epigenetics, and mitochondrial genetics**.** *Human Genomics*, 6:13

64. Lucas N., Schwartz S., Leroy R., Pavin S, Diserens K, Vuilleumier P (2013). Gambling against neglect: unconscious spatial biases induced by reward reinforcement in helathy people and brain-damaged patients. *Cortex*. 49: 2616-2627.

65. Lundqvist D., Bruce, N., & Öhman, A. (2015). Finding an emotional face in a crowd: emotional and perceptual stimulus factors influence visual search efficiency. *Cognition & emotion*, *29*(4), 621–633

66. Luttrull J. K. (2018). Improved retinal and visual function following panmacular subthreshold diode micropulse laser for retinitis pigmentosa. *Eye)*, *32*(6), 1099–1110.

67. Meador-Woodruff, J. H., Damask, S. P., Wang, J., Haroutunian, V., Davis, K. L., & Watson, S. J. (1996). Dopamine receptor mRNA expression in human striatum and neocortex. *Neuropsychopharmacology*, 15(1), 17–29.

68. Maniglia M., Pavan A., Sato G., Contemori G., Montemurro S., Battaglini L., Casco C. (2016). Perceptual learning leads to long lasting visual improvement in patients with central vision loss. *Research in Neurology and Neuroscience, 34*(5), 697–720.

69. Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S . Retinal damage by light in rats. *Investigative Ophthalmology* 1966; **5** (5): 450–473.

70. Noudoost, B., Moore, T. (2011). Control of visual cortical signals by prefrontal dopamine. *Nature*, *474*(7351), 372–375.

71. Oldehinkel, M., Llera, A., Faber, M., Huertas, I., Buitelaar, J. K., Bloem, B. R., Marquand, A. F., Helmich, R. C., Haak, K. V., & Beckmann, C. F. (2022). Mapping dopaminergic projections in the human brain with resting-state fMRI. *eLife*, *11*, e71846.

72. Orban, G. A., Van Calenbergh, F., De Bruyn, B., & Maes, H. (1985). Velocity discrimination in central and peripheral visual field. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics and image science*, *2*(11), 1836–1847.

73. Ouellette, B. G., & Casanova, C. (2006). Overlapping visual response latency distributions in visual cortices and LP-pulvinar complex of the cat. *Experimental Brain Research*, *175*(2), 332–341.

74. Palmer, L. A., Rosenquist, A. C., & Tusa, R. J. (1978). The retinotopic organization of lateral suprasylvian visual areas in the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, *177*(2), 237–256.

75. Pasternak, T., Merigan, W. H., Flood, D. G., & Zehl, D. (1983). The role of area centralis in the spatial vision of the cat. *Vision Research, 23*(12), 1409–1416.

76. Payne, B. R. (1993). Evidence for visual cortical area homologs in cat and macaque monkey. *Cerebral Cortex, 3*(1), 1–25.

77. Peck C.J., Lau B., Salzman C.D., (2013). The primate amygdala combines information about space and value. *Nature Neuroscience*,16(3):340-8.

78. Pereira, S. S., Botelho, E. P., Soares, J. G. M., Farias, M. F., & Gattass, R. (2022). Time course of dorsolateral geniculate nucleus plasticity in adult monkeys with laser-induced retinal lesions. *The Journal of Comparative Neurology*, *530*(13), 2385–2401.

79. Plank, T, Müller, M., Riedl, R., Stögbauer, F., & Fischer, M. (2014). Perceptual learning in patients with macular degeneration. *Frontiers in Psychology, 5*, 479.Piché, M., Thomas, S., & Casanova, C. (2013). Spatiotemporal profiles of neurons receptive fields in the cat posteromedial lateral suprasylvian cortex. *Neuroscience, 248*, 319–332.

80. Poggel, D. A., Treutwein, B., Sabel, B. A., Strasburger, H. (2015). A matter of time: improvement of visual temporal processing during training-induced restoration of light detection performance. *Frontiers in Psychology*, 6, 22

81. Pons, C., Jin, J., Mazade, R., Dul, M., Zaidi, Q., & Alonso, J. M. (2019). Amblyopia Affects the ON Visual Pathway More than the OFF. *The Journal of Neuroscience, 39*(32), 6276–6290.

82. Ptito M., Lepore F. (1983). Effects of unilateral and bilateral lesions of the lateral suprasylvian area of learning and interhemispheric transfer of pattern discrimination in the cat. *Behavioural Brain Research*, 7: 211-227.

83. Rosier, A. M., Arckens, L., Demeulemeester, H., Orban, G. A., Eysel, U. T., Wu, Y. J., & Vandesande, F. (1995). Effect of sensory deafferentation on immunoreactivity of GABAergic cells and on GABA receptors in the adult cat visual cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, *359*(3), 476–489.o

84. Rahimi-Nasrabadi, H., Jin, J., Mazade, R., Pons, C., Najafian, S., & Alonso, J. M. (2021). Image luminance changes contrast sensitivity in visual cortex. *Cell Reports*, *34*(5), 108692.

85. Saenz, M., Lewis, L. B., Huth, A. G., Fine, I., & Koch, C. (2008). Visual Motion Area MT+/V5 Responds to Auditory Motion in Human Sight-Recovery Subjects. *The Journal of Neuroscience*, *28*(20), 5141–5148.

86. Shamir, R. R., Friedman, Y. G., Joskowicz, L., Mimouni, M., & Blumenthal, E. Z. (2016). The influence of varying the number of characters per row on the accuracy and reproducibility of the ETDRS visual acuity chart. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, *254*(5), 971–976.

87. Strasburger, H., Rentschler, I., & Jüttner, M. (2011). Peripheral vision and pattern recognition: a review. *Journal of Vision*, *11*(5), 13.

88. Qu Y., Eysel U. T., Vandesande F., Arckens L. (2000). Effect of partial sensory deprivation on monoaminergic neuromodulators in striate cortex of adult cat. *Neuroscience* 101(4):863-868.

89. Raemaekers M., Bergsma D.P., van Wezel R.J., van der Wildt G.J., van den Berg A.V. (2011). Effects of Vision Restoration Training on Early Visual Cortex in Patients With Cerebral Blindness Investigated With Functional Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Neurophysiology*, 105(2): 872-882.

90. Raffelt, D. A., Tournier, J. D., Smith, R. E., Vaughan, D. N., Jackson, G., Ridgway, G. R., & Connelly, A. (2017). Investigating white matter fibre density and morphology using fixel-based analysis. *NeuroImage*, *144*(Pt A), 58–73.

91. Rakoczy, E. P., Yu, M. J., Nusinowitz, S., Chang, B., & Heckenlively, J. R. (2006). Mouse models of age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, *82*(5), 741–752.

92. Rapaport, D. H., & Stone, J. (1984). The area centralis of the retina in the cat and other mammals: focal point for function and development of the visual system. *Neuroscience*, *11*(2), 289–301.

93. Reinhard J., Schreiber A., Schiefer U., Kasten E., Sabel B.A., Kenkel S., Vonthein R., Trauzettel-Klosinski S. (2005). Does visual restitution training change absolute homonymous visual field defects? A fundus controlled study. *British Journal of Ophthalmology*, *89*(2):177-182.

94. Rioult-Pedotti M.S., Friedman D., Donoghue J.P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *Science*. 290:533–536.

95. Rogers G.L (2003). Functional magnetic resonance imaging (FMRI) and effects of L-dopa on visual function in normal and amblyopic patients. *Translational American Ophthalmological Society* 101:395-410.

96. Rosengarth K., Keck I, Brandl-Rühle S, Frolo J, Hufendiek K, Greenlee MW, Plank T. (2013). Functional and structural brain modifications induced by oculomotor training in patients with age-related macular degeneration. *Frontiers in Psychology*. 4: 428.

97. Sabel B.A. (2011). Vision restoration after brain and retina damage: the "residual vision activation theory". *Progress in Brain Research* 192 (1), 199-262.

98. Sabel B.A. (2004). Vision Restoration Therapy (VRT) for the treatment of visual field deficits after brain damage: the role of eye movements and fixation behavior. Journal of Vision 4 (11), 29-29.

99. Seger, C. A., & Miller, E. K. (2010). Category learning in the brain. *Annual Review of Neuroscience,* 33, 203–219.

100. Spear, D., Miller, S., Ohman, L. (1983). Effects of lateral suprasylvian visual cortex lesions on visual localization, discrimination, and attention in cats. *Behavioural Brain Research,* 10, 339–359.

101. Spear, P. D., & Baumann, T. P. (1979). Effects of visual cortex removal on receptive-field properties of neurons in lateral suprasylvian visual area of the cat. *Journal of Neurophysiology,* 42(1 Pt 1), 31–56.

102. Smolders, K., Vreysen, S., Laramée, M. E., Cuyvers, A., Hu, T. T., Van Brussel, L., Eysel, U. T., Nys, J., & Arckens, L. (2016). Retinal lesions induce fast intrinsic cortical plasticity in adult mouse visual system. *The European Journal of Neuroscience,* 44(5), 2165–2175.

103. Todd, R. M., Talmi, D., Schmitz, T. W., Susskind, J., Anderson, A. K. (2012). Psychophysical and neural evidence for emotion-enhanced perceptual vividness. *Journal of Neuroscience,* 2012–4010.

104. Waleszczyk, W. J., Wang, C., Young, J. M., Burke, W., Calford, M. B., & Dreher, B. (2003). Laminar differences in plasticity in area 17 following retinal lesions in kittens or adult cats. *The European Journal of Neuroscience,* 17(11), 2351–2368.

105. Wässle, H., Peichl, L., & Boycott, B. B. (1978). Topography of horizontal cells in the retina of the domestic cat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences,* 203(1152), 269–291.

106. Wiesel, T. N. (1960). Receptive fields of ganglion cells in the cat's retina. *The Journal of Physiology,* 153(3), 583–594.

107. Winkler, P. A., Occelli, L. M., & Petersen-Jones, S. M. (2020). Large animal models of inherited retinal degenerations: a review. *Cells,* 9(4), 882.

108. Vuilleumier, P. (2015). Affective and motivational control of vision. *Current Opinion in Neurology,* 28, 29–35.

109. Vuilleumier, P., Richardson, M. P., Armony, J. L., Driver, J., & Dolan, R. J. (2004). Distant influences of amygdala lesion on visual cortical activation during emotional face processing. *Nature Neuroscience,* 7(11), 1271–1278.

110. Yousif, N., Fu, R. Z., Bourquin, B. A., Bhrugubanda, V., Schultz, S. R., & Seemungal, B. M. (2016). Dopamine activation preserves visual motion perception despite noise interference of human V5/MT. *Journal of Neuroscience*, 36, 9303–9312.

111. Zaldivar, D., Rauch, A., Whittingstall, K., Logothetis, N. K., & Goense, J. (2014). Dopamine-induced dissociation of BOLD and neural activity in macaque visual cortex. *Current Biology*, 24, 2805–2811.

7. Publikacje Doktorantki

1. *__Kozak, A__., Ninghetto, M., Wieteska, M., Fiedorowicz, M., Wełniak-Kamińska, M., Kossowski, B., Eysel, U. T., Arckens, L., & Burnat, K. (2024). Visual training after central retinal loss limits structural white matter degradation: an MRI study. *Behavioral and Brain Function, 20*(1), 13.
2. Ninghetto, M., Wieteska, M., **Kozak, A**., Szulborski, K., Gałecki, T., Szaflik, J., & Burnat, K. (2024). Motion-Acuity Test for Visual Field Acuity Measurement with Motion-Defined Shapes. *Journal of Visualized Experiments*, (204), 10.3791/66272.
3. Ninghetto, M., **Kozak, A.,** Gałecki, T., Szulborski, K., Szaflik, J. P., Ołdak, M., Marchewka, A., & Burnat, K. (2024). Good vision without peripheries: behavioral and fMRI evidence. *Scientific Reports, 14*(1), 26264.
4. ***Kozak, A.,** Wieteska, M., Ninghetto, M., Szulborski, K., Gałecki, T., Szaflik, J., & Burnat, K. (2021). Motion-Based Acuity Task: Full Visual Field Measurement of Shape and Motion Perception. *Translational Vision Science & Technology*, *10*(1), 9.
5. Bierzynska, M., Sobczak, P. A., **Kozak, A.,** Bielecki, M., Strelau, J., & Kossut, M. M. (2019). No Risk, No Differences. Neural Correlates of Temperamental Traits Revealed Using Naturalistic fMRI Method. *Frontiers in Psychology*, *10*, 1757.
6. Debowska, W., Wolak, T., Nowicka, A., **Kozak, A.**, Szwed, M., & Kossut, M. (2016). Functional and Structural Neuroplasticity Induced by Short-Term Tactile Training Based on Braille Reading. *Frontiers in Neuroscience*, *10*.

***** Publikacje w których opisano wyniki będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej