

反复玻璃体腔注射雷珠单抗与阿柏西普对黄斑水肿患者角膜神经的影响

祁媛媛^{1,2}, 崔林¹, 张莉¹, 姜瑶¹, 纪莉莉¹, 邱媛媛¹, 闫春晓¹, 张立军^{1,2}

引用: 祁媛媛, 崔林, 张莉, 等. 反复玻璃体腔注射雷珠单抗与阿柏西普对黄斑水肿患者角膜神经的影响. 国际眼科杂志 2023; 23(5):848-851

作者单位:¹(116033)中国辽宁省大连市,大连医科大学附属大连市第三人民医院眼科 辽宁省角膜与眼表疾病重点实验室;²(116044)中国辽宁省大连市,大连医科大学
作者简介:祁媛媛,毕业于大连医科大学,在读博士研究生,主任医师,眼科教研室副主任,研究方向:眼底病、眼外伤。
通讯作者:张立军,毕业于解放军第二军医大学,博士,主任医师,院长,研究方向:角膜病、眼视光与屈光手术。
Lijunzhangw1970@163.com
收稿日期:2022-12-08 修回日期:2023-04-13

摘要

目的:探讨反复玻璃体腔注射雷珠单抗与阿柏西普对黄斑水肿患者角膜神经的影响。

方法:选取2021-06/2022-06在我院进行玻璃体腔注射抗血管内皮生长因子(VEGF)药物治疗的患者64例64眼,其中糖尿病性黄斑水肿20例20眼,湿性年龄相关性黄斑变性19例19眼,视网膜静脉阻塞25例25眼。采取3+PRN治疗方案,注药前和每次玻璃体腔注药后1mo时采用共聚焦显微镜采集角膜上皮基底膜下神经丛图像,测量角膜神经纤维长度和密度。

结果:玻璃体腔注射阿柏西普的患者注药前后术眼角膜神经纤维密度无显著变化($P>0.05$),但第2、3次注药后角膜神经纤维长度均低于注药前(均 $P<0.01$);玻璃体腔注射雷珠单抗的患者注药前后术眼角膜神经纤维密度和长度均无显著变化(均 $P>0.05$)。第3次注药后,两组患者术眼角膜神经纤维长度和密度均无显著差异(均 $P>0.05$)。

结论:反复玻璃体内注射抗VEGF药物会一定程度影响角膜神经,对多次注射抗VEGF药物的患者需关注角膜神经变化。

关键词:血管内皮生长因子;角膜;共聚焦显微镜;神经纤维长度;神经纤维密度;阿柏西普;雷珠单抗

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.5.25

Effect of repeated intravitreal Ranibizumab and Aflibercept injections on the corneal nerves in patients with macular edema

Yuan-Yuan Qi^{1,2}, Lin Cui¹, Li Zhang¹, Yao Jiang¹, Li-Li Ji¹, Yuan-Yuan Qiu¹, Chun-Xiao Yan¹, Li-Jun Zhang^{1,2}

¹Department of Ophthalmology, Dalian No. 3 People's Hospital Affiliated to Dalian Medical University; Key Laboratory of Corneal

and Ocular Surface Diseases Research of Liaoning Province, Dalian 116033, Liaoning Province, China; ²Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Correspondence to: Li-Jun Zhang. Department of Ophthalmology, Dalian No. 3 People's Hospital Affiliated to Dalian Medical University; Key Laboratory of Corneal and Ocular Surface Diseases Research of Liaoning Province, Dalian 116033, Liaoning Province, China; Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China. Lijunzhangw1970@163.com

Received:2022-12-08 Accepted:2023-04-13

Abstract

• AIM: To investigate the effect of repeated intravitreal injection of ranibizumab and aflibercept on corneal nerve of patients with macular edema.

• METHODS: A total of 64 patients (64 eyes) enrolled in our hospital from June 2021 to June 2022 were treated with intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF). There were 20 cases (20 eyes) of diabetic macular edema, 19 cases (19 eyes) of wet age-related macular degeneration and 25 cases (25 eyes) of retinal vein occlusion. Corneal confocal microscope was used to collect images of corneal subbasal nerve plexus before injections and at 1mo after each intravitreal injection based on 3+ pro re nata (PRN) treatment regimen. Furthermore, the length and density of corneal nerve were measured.

• RESULTS: There was no significant difference in corneal nerve density of patients injected with aflibercept between pre-injection and post-injection ($P>0.05$), while the corneal nerve length after 2nd and 3rd injections was lower than that of pre-injection (all $P<0.01$). There were no significant changes in corneal nerve density and length in patients with intravitreal injections of ranibizumab (all $P>0.05$), and there was no significant differences in corneal nerve density and length after 3 injections of the two drugs (all $P>0.05$).

• CONCLUSION: Repeated intravitreal anti-VEGF drug may affect corneal nerve to some extent. For patients who need repeated intravitreal injections of anti-VEGF, attention should be paid to the changes of corneal nerves.

• KEYWORDS: vascular endothelial growth factor; cornea; confocal microscope; nerve length; nerve density; Ranibizumab; Aflibercept

Citation: Qi YY, Cui L, Zhang L, et al. Effect of repeated intravitreal Ranibizumab and Aflibercept injections on the corneal nerves in patients with macular edema. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(5):848-851

0 引言

抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物被广泛应用于治疗眼底各类血管性疾病,如新生血管性年龄相关性黄斑变性^[1] (neovascular age-related macular degeneration, nARMD)、糖尿病性黄斑水肿 (diabetic macular edema, DME)^[2]、视网膜静脉阻塞 (retinal vein occlusion, RVO) 引起的黄斑水肿^[3]。因其在临床中需反复眼内注射才能稳定视功能的改善,因此,反复玻璃体腔注射引起的眼部及全身并发症已得到普遍关注^[4-5]。研究证实,贝伐单抗注射 1d 可在前房和角膜基层出现免疫标记^[6],说明其可以被动扩散到角膜基质,可能影响角膜神经。本研究利用角膜共聚焦显微镜对反复玻璃体腔注射雷珠单抗或阿柏西普治疗的眼底血管性疾病患者的角膜神经纤维长度和密度进行测量分析和比较,以评价反复玻璃体腔注射抗 VEGF 药物对角膜的安全性。

1 对象和方法

1.1 对象 前瞻性研究。选取 2021-06/2022-06 在我院进行玻璃体腔注射抗 VEGF 药物治疗的患者 64 例 64 眼,其中男 33 例,女 31 例;平均年龄 59.7 ± 8.065 岁;DME 患者 20 例 20 眼,nARMD 患者 19 例 19 眼,RVO 患者 25 例 25 眼;接受玻璃体腔注射阿柏西普治疗者 29 例 29 眼(阿柏西普组),接受玻璃体腔注射雷珠单抗治疗者 35 例 35 眼(雷珠单抗组);经过连续 3 次玻璃体腔注射治疗的患者 54 例 54 眼,经过 4 次连续玻璃体腔注射治疗的患者 10 例 10 眼。纳入标准:(1)临床确诊为 nARMD、DME、RVO,并因黄斑水肿需要进行抗 VEGF 治疗;(2)既往未接受任何眼内注射治疗;(3)无角膜接触镜配戴史;(4)无角膜屈光手术或内眼手术史;(5)玻璃体腔注射前 3mo 内无眼部激光治疗史。排除标准:(1)合并角膜疾病、眼表疾病;(2)合并其他视网膜或视神经疾病;(3)患有免疫系统疾病。本研究符合《赫尔辛基宣言》,并获得医院伦理审查委员会批准(批准号:2022-001-001),所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 玻璃体腔注射方法:充分清洗结膜囊后使用盐酸丙美卡因连续点眼 3 次,每次间隔 5min,常规消毒、铺巾,使用聚维酮碘浸泡结膜囊,30G 针头于角膜缘后 3.5 ~ 4.0mm 将雷珠单抗 (0.5mg/0.05mL)/阿柏西普 (2mg/0.05mL) 注射至玻璃体腔。术后使用左氧氟沙星滴眼液,每日 4 次,连续使用 7d。纳入患者均采取 3+PRN 治疗方案,3 针起始注射后随访过程中,若视力下降大于 5 个字母或中心视网膜厚度增加大于 100 μ m 或再次出现视网膜内液、视网膜下液或黄斑新鲜出血,需再次行玻璃体腔注射。

1.2.2 观察指标 注药前和每次玻璃体腔注药后 1mo 时行最佳矫正视力 (BCVA)、眼压 (IOP)、裂隙灯、眼底镜、光学相干断层扫描 (SD-OCT) 等检查,评估治疗效果并拟定下一步治疗方案,同时行角膜共聚焦显微镜检查测量角膜神经纤维长度 (cornea nerve fiber length, CNFL) 和角膜神经纤维密度 (cornea nerve fiber density, CNFD)。本研究使用的 HRT III 共聚焦显微镜采用波长 670nm 的红色激光,通过高数值孔径物镜联合反射显微镜和荧光显微镜的反射激光束及固有光束进行观察,平均放大约 800 倍,拍摄范围 400 μ m \times 400 μ m (384 像素 \times 384 像素),对整个角膜的不

同位置进行拍摄,最终选择角膜上皮中央区 6mm 范围内上皮基底膜下神经丛 (subbasal nerve plexus, SBNP) 的图像,采用 Image J 图像处理软件分析。每次检查均由同一名经验丰富的检查人员操作,选取中央区 SBNP 图像质量最清晰的 3 张图片进行数据分析,取平均值。角膜神经纤维长度指每平方毫米内神经纤维的总长度;角膜神经纤维密度指每平方毫米范围内神经纤维的数量。

统计学分析:采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析;重复测量资料采用重复测量数据方差分析,组内两两比较采用 LSD-*t* 检验。非正态分布的计量资料采用中位数 (四分位间距) 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,组间两两比较采用 Bonferroni 法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者基线资料比较 根据玻璃体腔注射药物不同将纳入患者分为两组,阿柏西普组患者 29 例 29 眼,其中男 17 例,女 12 例,年龄 61.03 ± 1.025 岁,包括 nARMD 患者 11 例 11 眼,DME 患者 11 例 11 眼,RVO 患者 7 例 7 眼;雷珠单抗组患者 35 例 35 眼,其中男 16 例,女 19 例,年龄 58.60 ± 1.627 岁,包括 nARMD 患者 8 例 8 眼,DME 患者 9 例 9 眼,RVO 患者 18 例 18 眼。两组患者性别构成、年龄、疾病类型等基线资料比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。纳入患者均随访 3~6mo,期间未发生系统性或眼部不良事件。

2.2 两组患者治疗前后角膜神经的变化 注药前后,阿柏西普组患者术眼角膜神经纤维密度无显著变化 ($P > 0.05$),但第 2、3 次注药后角膜神经纤维长度均低于注药前,差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$);注药前后,雷珠单抗组患者术眼角膜神经纤维密度和长度均无显著变化 ($P > 0.05$)。注药前、第 3 次注药后,两组患者术眼角膜神经纤维密度和长度组间差异均无统计学意义 (注药前: $t = 0.986, 1.222, P = 0.328, 0.226$;第 3 次注药后: $t = 0.010, -0.728, P = 0.992, 0.470$),见表 1。

2.3 不同疾病患者治疗前后角膜神经的变化 注药前,不同疾病类型患者术眼角膜神经纤维密度和长度差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);第 3 次注药后,不同疾病类型患者术眼角膜神经纤维密度差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但 DME 患者术眼角膜神经纤维长度明显低于 nARMD 和 RVO 患者 ($P < 0.05$),且 nARMD 和 RVO 患者术眼角膜神经纤维长度差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

3 讨论

角膜是人体中神经分布最密集的组织,其透明和无血管的生理特性确保了清晰的视力。角膜主要由三叉神经的眼支支配,其在角膜基质中形成上皮神经丛,其上升分支穿过前弹力层并广泛终止于表面上皮层内^[7-8]。角膜神经通过释放神经营养因子维持完整和健康的眼表结构和功能,发挥重要的神经营养作用,是维持眼表稳态、角膜敏感性、上皮健康和伤口愈合的主要决定因素^[9]。角膜神经支配损伤或丧失会导致角膜神经纤维密度降低、角膜敏感性减弱、干眼、伤口愈合延迟,随后发展为角膜溃疡、穿孔,甚至失明^[10]。

雷珠单抗 (Ranibizumab) 是一种人源化单克隆抗体

表1 两组患者注药前后角膜神经的变化

组别	观察指标	注药前	第1次注药后	第2次注药后	第3次注药后	F	P
阿柏西普组 (n=29)	神经纤维密度(/mm ²)	49.35±15.07	47.62±13.40	45.90±10.72	45.26±8.94	1.964	0.150
	神经纤维长度(mm/mm ²)	133.77±39.24	122.18±48.68	118.32±39.39 ^a	114.64±36.13 ^{a,c}	5.687	0.006
雷珠单抗组 (n=35)	神经纤维密度(/mm ²)	45.36±16.97	47.74±14.16	47.14±11.07	45.24±9.64	0.587	0.517
	神经纤维长度(mm/mm ²)	120.49±46.38	129.31±41.38	124.26±34.91	120.93±32.93	1.481	0.235

注:^aP<0.05 vs 注药前;^cP<0.05 vs 第2次注药后。

表2 不同疾病患者注药前后角膜神经的变化

疾病类型	眼数	神经纤维密度(/mm ²)		神经纤维长度(mm/mm ²)	
		注药前[M(P ₂₅ ,P ₇₅)]	第3次注药后[M(P ₂₅ ,P ₇₅)]	注药前($\bar{x}\pm s$)	第3次注药后[M(P ₂₅ ,P ₇₅)]
DME	20	40.625(37.50,48.44)	43.750(37.56,43.75)	116.26±39.15	104.120(77.23,120.70)
nARMD	19	50.000(43.75,62.50)	43.750(43.75,50.00)	133.86±38.07	135.120(109.89,144.66) ^a
RVO	25	43.750(31.25,62.50)	43.750(37.50,53.13)	129.11±50.23	137.690(98.69,158.89) ^a
F/X ²		3.517	3.066	0.868	8.200
P		0.172	0.216	0.425	0.017

注:^aP<0.05 vs DME。

片段,可中和所有已知活性形式的 VEGF-A。阿柏西普(Aflibercept)是人 VEGF 受体 1 和受体 2 胞外区结合域与人免疫球蛋白 Fc 段重组形成的融合蛋白,可与 VEGF-A 的所有亚型、VEGF-B 及 PIGF 结合,抑制其与 VEGF 受体的结合和激活。这两种药物现已广泛通过玻璃体腔注射治疗眼底血管性疾病^[11-13]。然而,VEGF 的作用并不局限于诱导血管生成和增加血管通透性。研究显示,VEGF 通过介导神经保护和神经营养活性的神经元表达^[14-16],并且 VEGF 对小鼠角膜周围三叉神经丛的生长有显著影响,提示 VEGF 信号通路的阻断会损害损伤后 SBNP 再生^[17]。因此,反复玻璃体腔注射抗 VEGF 药物可能会对角膜 SBNP 产生不利影响。Dong 等^[18]对正常鼠结膜下注射贝伐单抗进行研究发现,贝伐单抗会明显引起角膜神经衰退、感觉变迟钝、上皮修复延迟、影响角膜神经再生。Polat 等^[19]使用共聚焦显微镜观察多次玻璃体腔注射抗 VEGF 药物对角膜神经纤维和角膜敏感度的影响,发现多次玻璃体腔注射抗 VEGF 药物对角膜 SBNP 有影响,也会使角膜敏感度降低。但也有研究发现,雷珠单抗对 nARMD 患者的角膜敏感性和 SBNP 无明显影响^[20]。

角膜共聚焦显微镜是一种详细研究角膜神经精细结构的重要方法,其以无创的方式实现角膜神经纤维的实时可视化,允许在患者和动物模型中进行长期纵向研究^[21],获得的角膜图像可以通过适当的软件进行分析,以识别定量指标。本研究通过角膜共聚焦显微镜获得 SBNP 图像,并通过 Image J 软件进行数据分析,以评价雷珠单抗及阿柏西普反复多次玻璃体腔注射对人角膜神经的影响。结果发现,阿柏西普第 2、3 次注射后角膜神经纤维长度均低于注药前,差异有统计学意义,而雷珠单抗多次玻璃体腔注射后角膜神经纤维密度和长度在各时间点差异均无统计学意义。所以反复玻璃体腔注射抗 VEGF 药物会一定程度减少角膜神经纤维长度,注射阿柏西普相比雷珠单抗对角膜神经纤维长度的影响可能更大。眼内注射 2mg 阿柏西普的摩尔浓度为 348nmol/mL,眼内注射 0.5mg 雷珠单抗的摩尔浓度为 208nmol/mL,也就是说,同样注射 0.05mL 的阿柏西普比雷珠单抗摩尔浓度更高,同时阿柏西

普的玻璃体内活性比雷珠单抗更长^[22],所以推测阿柏西普因为摩尔浓度更高且活性更长,使其潜在的有利和不利影响均更强。

本研究比较了三种不同疾病患者的角膜神经情况,结果发现,基线时 DME 患者术眼角膜神经纤维密度和长度均低于 nARMD 和 RVO 患者,但差异均无统计学意义。第 3 次玻璃体腔注射后,DME 患者术眼角膜神经纤维长度均低于 nARMD 和 RVO 患者,差异均有统计学意义,而 nARMD 和 RVO 患者第 3 次玻璃体腔注射后术眼角膜神经纤维长度和密度差异均无统计学意义。据报道,糖尿病患者相比其他疾病患者更易表现出角膜神经纤维的渐进性丧失和角膜敏感性下降^[23]。因此多次注射抗 VEGF 药物更容易引起糖尿病患者角膜神经改变。既往研究报道,在糖尿病伴/不伴糖尿病视网膜病变发展 4a 的患者中,角膜神经纤维长度相对于神经纤维密度更为敏感^[24]。故本研究中多次玻璃体腔注射抗 VEGF 药物后,对糖尿病患者的角膜神经纤维长度有一定影响,而对角膜神经密度无明显影响。

本研究显示,反复玻璃体腔注射抗 VEGF 药物会一定程度影响角膜神经,对于临床上需多次玻璃体腔注射抗 VEGF 药物治疗的眼底疾病患者,需关注角膜神经的变化,尤其是糖尿病患者,多次玻璃体腔注射后不仅会对角膜神经产生一定影响,也会降低角膜敏感性,从而增加潜在的感染机会。治疗后应嘱患者注意避免用力揉眼,加强局部抗炎,同时给予人工泪液保护眼表微环境。雷珠单抗与阿柏西普的作用靶点不完全相同,目前关于两种药物因靶点不同对角膜神经产生影响的报道较少,我们会进一步通过动物实验或体外实验验证本研究结果,并探讨其作用机制。此外,本研究随访时间较短,后续仍需要扩大样本量,同时延长随访时间进一步观察研究结论的准确性。

参考文献

1 Ricci F, Bandello F, Navarra P, et al. Neovascular age-related macular degeneration: therapeutic management and new-upcoming approaches. *Int J Mol Sci* 2020; 21(21): 8242
 2 Amoaku WM, Ghanchi F, Bailey C, et al. Diabetic retinopathy and

diabetic macular oedema pathways and management; UK Consensus Working Group. *Eye (Lond)* 2020; 34(Suppl 1): 1–51

3 Schmidt–Erfurth U, Garcia–Arumi J, Gerendas BS, *et al.* Guidelines for the management of retinal vein occlusion by the European society of retina specialists (EURETINA). *Ophthalmologica* 2019; 242 (3) : 123–162

4 Kitchens JW, Do DV, Boyer DS, *et al.* Comprehensive review of ocular and systemic safety events with intravitreal aflibercept injection in randomized controlled trials. *Ophthalmology* 2016; 123(7): 1511–1520

5 Maloney MH, Payne SR, Herrin J, *et al.* Risk of systemic adverse events after intravitreal bevacizumab, ranibizumab, and aflibercept in routine clinical practice. *Ophthalmology* 2021; 128(3): 417–424

6 Dratviman–Storobinsky O, Lubin BC, Hasanreisoglu M, *et al.* Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injection on angiogenic gene expression levels in a mouse model of corneal neovascularization. *Mol Vis* 2009; 13(15): 2326–2338

7 Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor; signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neuro–Signals* 2005; 14(5): 207–221

8 Hulse RP, Beazley–Long N, Ved N, *et al.* Vascular endothelial growth factor–A165b prevents diabetic neuropathic pain and sensory neuronal degeneration. *Clin Sci (Lond)* 2015; 129(8): 741–756

9 Labetoulle M, Baudouin C, Calonge M, *et al.* Role of corneal nerves in ocular surface homeostasis and disease. *Acta Ophthalmol* 2019; 97(2): 137–145

10 Shaheen BS, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol* 2014; 59(3): 263–285

11 Yin XB, He T, Yang SS, *et al.* Efficacy and safety of antivascular endothelial growth factor (anti – VEGF) in treating neovascular age – related macular degeneration (AMD); a systematic review and meta – analysis. *J Immunol Res* 2022; 2022: 6004047

12 Uludag G, Hassan M, Matsumiya W, *et al.* Efficacy and safety of intravitreal anti – VEGF therapy in diabetic retinopathy; what we have learned and what should we learn further? *Expert Opin Biol Ther* 2022; 22(10): 1275–1291

13 Corazza P, D’Alterio FM, Savastano MC, *et al.* Long–term outcomes of anti–VEGF treatment of macular oedema due to retinal vein occlusions.

Eur J Ophthalmol 2022; 32(6): 3536–3546

14 Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1999; 19(14): 5731–5740

15 Nishijima K, Ng YS, Zhong LC, *et al.* Vascular endothelial growth factor – a is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol* 2007; 171(1): 53–67

16 Li ZJ, Burns AR, Han L, *et al.* IL–17 and VEGF are necessary for efficient corneal nerve regeneration. *Am J Pathol* 2011; 178 (3) : 1106–1116

17 Yu CQ, Zhang M, Matis KI, *et al.* Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(9): 3870–3878

18 Dong MC, Di GH, Zhang XP, *et al.* Subconjunctival bevacizumab injection impairs corneal innervations and epithelial wound healing in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58(3): 1469–1477

19 Polat OA, Şener H, Erkiş K. Corneal nerve fiber and sensitivity loss after repeated intravitreal anti – VEGF injections; an *in vivo* confocal microscopy study. *Cornea* 2022; 41(3): 317–321

20 Bitirgen G, Belviranlı S, Malik RA, *et al.* Assessment of corneal sensation, innervation and retinal nerve fiber layer in patients treated with multiple intravitreal ranibizumab injections. *PLoS One* 2017; 12 (1) : e0170271

21 Leckelt J, Guimarães P, Kott A, *et al.* Early detection of diabetic neuropathy by investigating CNFL and IENFD in thyl – YFP mice. *J Endocrinol* 2016; 231(2): 147–157

22 Stewart MW, Rosenfeld PJ. Predicted biological activity of intravitreal VEGF Trap. *Br J Ophthalmol* 2008; 92(5): 667–668

23 Pritchard N, Edwards K, Russell AW, *et al.* Corneal confocal microscopy predicts 4 – year incident peripheral neuropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2015; 38(4): 671–675

24 Srinivasan S, Dehghani C, Pritchard N, *et al.* Ophthalmic and clinical factors that predict four – year development and worsening of diabetic retinopathy in type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 2018; 32 (1) : 67–74