

Lek. Magdalena Kupis

Ocena zmian w gęstości i morfologii czopków, stanu naczyń siatkówki w czasie trwania cukrzycy z zastosowaniem technologii optyki adaptywnej

Assessment of retinal photoreceptors and microvascular changes measured with Adaptive Optics occurring over time in diabetes mellitus

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Jacek P. Szaflik

Katedra i Klinika Okulistyki Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu
Medycznego,
ul. Marszałkowska 24/26 00-576 Warszawa



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024 r.

Słowa kluczowe:

Cukrzyca, retinopatia cukrzycowa, BMI, technologia rtx1™, optyka adaptacyjna, morfologia czopków, mikrokążenie siatkówki

Key words:

Diabetes mellitus, diabetic retinopathy, BMI, rtx1™ technology, adaptive optics, cone morphology, retinal microcirculation

Rozprawę doktorską dedykuję moim rodzicom, Marcinowi oraz Helenie.
Dziękuję Wam za to, że zawsze mnie wspieraliście.



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

BIBLIOTEKA UCZELNIANA

Nr referencyjny
BIBG/Punktacja/154/2024/JL

Warszawa, 05.04.2024


Sz. Pani
Magdalena Kupis

ANALIZA BIBLIOMETRYCZNA PUBLIKACJI
PANI MAGDALENY KUPIS,
WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Lp.	Opis bibliograficzny	Impact Factor	MNiSW
Artykuły			
1.	Kupis M [aut. koresp.], Wawrzyniak Z, Szaflik J, Zaleska-Żmijewska A. Retinal Photoreceptors and Microvascular Changes in the Assessment of Diabetic Retinopathy Progression: A Two-Year Follow-Up Study. <i>Diagnostics</i> . 2023;13(15):1-12 (rodzaj publikacji: praca oryginalna)	3,6	70
2.	Kupis M [aut. koresp.], Samelska K, Szaflik J, Skopiński P. Novel therapies for diabetic retinopathy. <i>Central European Journal of Immunology</i> . 2022;47(1):102-108 (rodzaj publikacji: praca poglądowa)	1,3	70
3.	Zaleska-Żmijewska A, Wawrzyniak Z, Kupis M [aut. koresp.], Szaflik J. The Relation between Body Mass Index and Retinal Photoreceptor Morphology and Microvascular Changes Measured with Adaptive Optics (rtx1) High-Resolution Imaging. <i>Journal of Ophthalmology</i> . 2021;2021:1-9 (rodzaj publikacji: praca oryginalna)	1,974	70
4.	Kupis M [aut. koresp.], Samelska K, Zaleska-Żmijewska A, Szaflik J. Wprowadzenie do patofizjologii retinopatii cukrzycowej. <i>Klinika Oczna</i> . 2021;123(2):69-73 (rodzaj publikacji: praca poglądowa)	-	40
Łącznie:		6,874	250
Książki			
1.	-		
Rozdziały w książkach			
1.	-		

ul. Żwirki i Wigury 63
02-091 Warszawa
www.biblioteka.wum.edu.pl

tel.: +48 22 116 60 11
biblioteka@wum.edu.pl

p.o. DYREKTOR
Biblioteki Uczelnianej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

mgr Agnieszka Czarnecka

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW.....	6
STRESZCZENIE.....	10
ABSTRACT.....	11
1. WPROWADZENIE.....	12
1.1 RETINOPATIA CUKRZYCOWA- EPIDEMIOLOGIA I KLASYFIKACJA.....	12
1.2 RETINOPATIA CUKRZYCOWA- PATOFIZJOLOGIA.....	13
1.3 DIAGNOSTYKA RETINOPATII CUKRZYCOWEJ- ZŁOTY STANDARD ORAZ NOWOCZESNE TECHNOLOGIE.....	14
1.4 RETINOPATIA CUKRZYCOWA- TERAPIA.....	15
2. CEL PRACY.....	19
2.1 ARTYKUŁ: “INTRODUCTION TO PATHOPHYSIOLOGY OF DIABETIC RETINOPATHY”.....	20
2.2 ARTYKUŁ: “THE RELATION BETWEEN BODY MASS INDEX AND RETINAL PHOTORECEPTOR MORPHOLOGY AND MICROVASCULAR CHANGES MEASURED WITH ADAPTIVE OPTICS (RTX1) HIGH-RESOLUTION IMAGING”.....	27
2.3 ARTYKUŁ: “RETINAL PHOTORECEPTORS AND MICROVASCULAR CHANGES IN THE ASSESSMENT OF DIABETIC RETINOPATHY PROGRESSION: A TWO-YEAR FOLLOW-UP STUDY”.....	38
2.4 ARTYKUŁ: “NOVEL THERAPIES FOR DIABETIC REINOPATHY”.....	52
3. DYSKUSJA.....	61
4. BIBLIOGRAFIA.....	65
ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ.....	73
OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI.....	74

Wykaz skrótów

Skrót	z języka angielskiego	język polski
DM	Diabetes mellitus	Cukrzyca
GDM	Gestational diabetes	Cukrzyca ciężarnych
ICA	Islet cell antibodies	Przeciwciała przeciwko antygenom wysp trzustkowych
MODY	Maturity onset diabetes of the young	Cukrzyca typu MODY
DME	Diabetic macular edema	Cukrzycowy obrzęk plamki żółtej
DR	Diabetic retinopathy	Retinopatia cukrzycowa
NPDR	Nonproliferative diabetic retinopathy	Nieproliferacyjna retinopatia cukrzycowa
PDR	Proliferative diabetic retinopathy	Proliferacyjna retinopatia cukrzycowa
AAO	American Academy of Ophthalmology	Amerykańska Akademia Okulistyki
NVD	Neovascularization of the disc	Neowaskularyzacja na tarczy n. II
NVE	Neovascularization elsewhere	Neowaskularyzacja siatkówkowa obwodowa
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

OCT	Optical coherence tomography	Optyczna koherentna tomografia
SD-OCT	Spectral domain optical coherence tomography	Optyczna koherentna tomografia w domenie spektralnej
PS-OCT	Polarization-sensitive optical coherence tomography	Polaryzacyjna optyczna koherentna tomografia
FA	Fluorescein angiography	Angiografia fluoresceinowa
RPE	Retinal pigment epithelium	Nabłonek barwnikowy siatkówki
OCTA	Optical coherence tomography angiography	Angiografia optycznej koherentnej tomografii
FAZ	Foveal avascular zone	Dołkowa strefa beznaczyniowa
AO	Adaptive optics	Optyka adaptacyjna
ADA	American Diabetes Association	Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study	Badanie UKPDS
SN-DREAMS II	Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular-genetics Study	Badanie SN-DREAMS II
FDA	Food and Drug Administration	Amerykańska Agencja do spraw Żywności i Leków
AMD	Age-related macular degeneration	Zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem

BMI	Body mass index	Wskaźnik masy ciała
PKC	Protein kinase C	Kinaza białkowa C
IGF-1	Insulin-like growth factor	Insulinopodobny czynnik wzrostu
IMT	Intima-media thickness	Wskaźnik IMT
WLR	Wall-to-lumen ratio	Współczynnik WLR
BCVA	Best corrected visual acuity	Najlepsza skorygowana ostrość wzroku
CaD	Calcium dobesilate	Dobesylan wapnia
NAC	N-acetylcysteine	N-acetylocysteina
SGLT2	Sodium-dependent glucose transporter 2	Inhibitor kotransportera glukozowo-sodowego 2
AAV	Adeno-associated viruses	Wirusy zależne od adenowirusów
PEDF	Pigment epithelium derived factor	Czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki
ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2	Inhibitor konwertazy angiotensyny 2

BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
BMSCs	Bone marrow mesenchymal stromal cells	Komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego
BM	Basement membrane	Błona podstawna
ERG	Electroretinography	Elektroretinografia
CRT	Central retinal thickness	Centralna grubość siatkówki
ICGA	Indocyanine green angiography	Angiografia indocyjaninowa
SCP	Superficial capillary plexus	Powierzchnowy splot naczyniowy siatkówki
DCP	Deep capillary plexus	Głęboki splot naczyniowy siatkówki
WT	Wall thickness	Grubość ściany naczynia
LD	Lumen diameter	Wymiar światła naczynia
VD	Vessel diameter	Wymiar naczynia
WCSA	The cross-sectional area of the vascular wall	Współczynnik powierzchni przekroju ściany naczynia

Streszczenie

Cukrzyca to przewlekła choroba metaboliczna, charakteryzująca się hiperglikemią, wynikającą z zaburzenia wydzielania lub działania insuliny. Retinopatia cukrzycowa należy do mikronaczyniowych powikłań cukrzycy i jest w krajach rozwiniętych jedną z głównych przyczyn ślepoty.

Nieprawidłowy poziom glukozy uszkadza barierę krew-siatkówka, doprowadza do niedokrwienia siatkówki i pobudza neowaskularyzację. Zwiększona aktywność kinazy białkowej C, czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego oraz zjawisko leukostazy to główne mechanizmy patogenezy retinopatii cukrzycowej.

W terapii retinopatii cukrzycowej rutynowo stosuje się fotokoagulację siatkówki oraz iniekcje doszkliskowe z zastosowaniem inhibitorów angiogenezy oraz leków przeciwwzapalnych. Późne powikłania mogą zostać zaopatrzone chirurgicznie poprzez wykonanie zabiegu witrektomii. Nowe alternatywne metody terapeutyczne wykorzystują substancje o działaniu antyoksydacyjnym, komórki macierzyste czy przeszczepy wysepek trzustkowych.

Standardowo rozpoznanie retinopatii cukrzycowej opiera się na badaniu dna oka w lampie szczelinowej, obrazowaniu siatkówki za pomocą angiografii fluoresceinowej oraz optycznej koherentnej tomografii (w tym z opcją uwidaczniającą naczynia).

Nową metodą, stosowaną w diagnostyce retinopatii cukrzycowej, jest optyka adaptacyjna. Urządzeniem wykorzystującym innowacyjną technologię jest aparat rtx1TM (Imagine Eyes, Orsay, France), który pozwala obrazować pojedyncze komórki receptorowe siatkówki oraz mikronaczynia siatkówki. Badanie ma nieinwazyjny charakter, jest powtarzalne i łatwe do wykonania.

W toku przewodu doktorskiego przeprowadzono badanie, którego celem była analiza wpływu wartości wskaźnika BMI na morfologię siatkówki. Grupa badana liczyła 28 kobiet ze stwierdzoną nadwagą i otyłością; grupę kontrolną tworzyło 19 kobiet z BMI < 25 kg/m². Analiza skanów wykonanych za pomocą aparatu rtx1TM wykazała, iż średni wymiar światła, jak i całego naczynia nie jest istotnie zależny od wartości BMI. W grupie osób z nadwagą lub otyłością zaobserwowano wczesne objawy patologii naczyniowej, takie jak, zwiększona grubość ściany naczynia, zwiększony współczynnik WLR i WCSA.

W toku przewodu doktorskiego zastosowano aparat rtx1TM do oceny zmian w gęstości i morfologii czopków, stanu naczyń siatkówki w czasie trwania cukrzycy. Do badania włączono 50 osób z rozpoznaną cukrzycą (typ 1 lub 2) oraz 18 zdrowych osób, tworzących grupę kontrolną. Pacjenci uczestniczyli w 3 wizytach- wstępnej, po roku oraz po 2 latach. Każda wizyta obejmowała ocenę ostrości wzroku, pomiar centralnej grubości siatkówki z użyciem aparatu OCT Triton oraz skany okołodołkowych miejsc siatkówki i tętniczek siatkówki uzyskanych przy pomocy kamery rtx1TM.

Już na początku badania udowodniono, iż gęstość czopków pacjentów z cukrzycą była istotnie mniejsza niż w grupie kontrolnej. Ponadto, w 2-letniej obserwacji parametry czopkowe uległy większym zmianom w grupie badanej niż grupie kontrolnej. W toku trwania choroby udowodniono zmiany w morfologii naczyń- zwiększenie grubości ścian naczyń oraz współczynnika WLR.

Kamera rtx1TM znalazła zastosowanie w detekcji wczesnych zaburzeń mikrostruktury siatkówki w przebiegu otyłości, stanu przedcukrzycowego czy początkowych stadiach retinopatii cukrzycowej. Optyka adaptacyjna jest obiecującym narzędziem zarówno do wczesnej diagnostyki, analizy patofizjologii, jak i przyszłych odkryć terapeutycznych chorób metabolicznych.

Abstract

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease characterized by hyperglycaemia resulting from the insulin malsecretion or malfunction. Diabetic retinopathy is a microvascular complication of diabetes mellitus and has become one of the leading causes of blindness in developed countries.

Abnormal blood glucose levels cause loss of the blood-retinal barrier integrity, retinal ischemia and stimulate retinal neovascularization. An increased activity of protein kinase C, vascular endothelial growth factor and a process of leukostasis are the main pathways of the diabetic retinopathy pathogenesis.

The standard treatment involves laser therapy and intravitreal drug administration of angiogenesis inhibitors and anti-inflammatory agents. Late complications of diabetic retinopathy may be surgically managed by the vitrectomy procedure. Novel alternative therapeutic options in the diabetic retinopathy include antioxidative agents, mesenchymal stem cells and islet cell transplantation.

The standard diagnostic process requires a fundus examination at the slit lamp and a retinal imaging compromised by fluorescein angiography and optical coherence tomography (with vascular assessment).

Adaptive optics technology is a novel tool in the diabetic retinopathy diagnosis. Rtx1TM (Imagine Eyes, Orsay, France) is a device using the innovative technique, that allows the visualization of single retinal cells (photoreceptors) and microcirculation. The measurements are non-invasive, repeatable and easy to perform.

The doctoral study analysed a possible influence of BMI values on the retinal microstructure. The study group consisted of 28 women diagnosed with overweight or obesity; the control group involved 19 women with BMI <25. Rtx1TM camera analysis showed that the mean lumen and total diameter of the analysed retinal arteries were not significantly BMI dependant. The study revealed some early symptoms of vascular pathology such as the increased thickness of retinal arterioles, higher WLR and WCSA parameters in obese and overweight women.

Rtx1TM technology was successfully used in the doctoral study as a method of photoreceptors and retinal vasculature assessment over time in patients with diabetic retinopathy. The study involved 50 diabetic individuals (type-1 or type-2 diabetes mellitus) and 18 healthy volunteers. The patients participated in 3 visits- the initial visit and two follow-up appointments, one and two years after the study. Each visit consisted of best-corrected visual acuity (BCVA) assessment, OCT macula scanning (3D DRI OCT Triton) with central retinal thickness (CRT) evaluation and AO retinal image acquisition.

The initial phase of study revealed that the cone density in diabetic patients was significantly lower than in the controls. Moreover, in a 2-year follow-up, cone parameters' changes were more substantial in the diabetic than in the healthy group. Microvascular retinal morphology changes such as the increase in WLR and the mean value of artery walls were observed throughout the diabetes mellitus duration.

The rtx1TM camera was applied in the early detection of disruption in the retinal microstructure throughout the course of the obesity, the prediabetes and the early stages of diabetic retinopathy. Adaptive optics is a promising tool in the early diagnosis, pathophysiology analysis as well as future therapeutic discoveries in the metabolic diseases.

1. Wprowadzenie

Cukrzyca to grupa zaburzeń metabolicznych, charakteryzująca się przewlekłą hiperglikemią. Nieprawidłowa glikemia w toku trwania choroby przyczynia się do rozwoju mikro i makroangiopatii, neuropatii oraz zmian wielonarządowych.

Klasyfikacja WHO obejmuje podział cukrzycy na 4 grupy główne: cukrzycę typu 1 (ang. *Diabetes mellitus type 1*- DM1), cukrzycę typu 2 (ang. *Diabetes mellitus type 2*- DM2), cukrzycę o znanej etiologii oraz cukrzycę ciężarnych (ang. *Gestational diabetes-GDM*) [1].

Cukrzyca typu 1 jest związana z destrukcją komórek β trzustki, co prowadzi do bezwzględnej niedoboru insuliny. Najczęstszą przyczyną tego zjawiska jest proces immunologiczny związany z obecnością w surowicy przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom wysp trzustkowych (ang. *Islet cell antibodies, ICA*), dekarboksylazie kwasu glutaminowego (anty-GAD), fosfatazie tyrozyny IA-2 i IA-2 β , transporterom cynku oraz przeciwko insulinie [2]. Patogeneza cukrzycy typu 2 jest oparta na insulinooporności tkanek obwodowych oraz współistniejącym defekcie wydzielania insuliny. Cukrzyca o znanej etiologii to grupa obejmująca cukrzycę monogenową (cukrzycę noworodkową, cukrzycę typu MODY (ang. *Maturity onset diabetes of the young*)), cukrzycę związaną z chorobami trzustki (mukowiscydozą, zapaleniem trzustki), a także cukrzycę indukowaną lekami (m.in. posterydową). Cukrzyca ciężarnych występuje jedynie u kobiet w ciąży, a patofizjologia choroby przypomina mechanizm rozwoju cukrzycy typu 2 [3].

Na całym świecie obserwowany jest stały wzrost zachorowalności na cukrzycę, a choroba jest powszechnie nazywana globalną epidemią. W 2019 roku Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna [4] oszacowała, iż w ciągu 25 lat liczba chorych wzrośnie z 463 do 700 milionów. Szacuje się, iż w 2030 roku grupa pacjentów z rozpoznaniem cukrzycowym obrzękiem płamki żółtej (ang. *Diabetic macular edema – DME*) wyniesie 24 miliony [5].

Do wzrostu zachorowań przyczynia się zmiana stylu życia oraz rosnąca przeciętna długość życia globalnej populacji. Nieodwracalnym skutkiem większej zapadalności na cukrzycę są rosnące koszty leczenia, które istotnie obciążają światowe systemy zdrowotne.

Według danych Narodowego Funduszu Zdrowia w 2018 roku w Polsce było 2,86 miliona dorosłych ze zdiagnozowaną cukrzycą [6]. Trend wzrostu zachorowalności nie ominie Polski, a polska służba zdrowia będzie musiała mierzyć się z masowym leczeniem samej choroby oraz jej licznych powikłań.

1.1 Retinopatia cukrzycowa- epidemiologia i klasyfikacja

Retinopatia cukrzycowa (ang. *Diabetic retinopathy- DR*) jest jednym z najczęstszych powikłań cukrzycy, zaliczanych do zaburzeń mikronaczyniowych. Pacjenci z dobrze kontrolowaną glikemią, wynikającą z właściwej terapii hipoglikemizującej, mogą utrzymać ostrość wzroku na zadowalającym poziomie. Niestety, utrzymująca się nieprawidłowa glikemia i rosnąca insulinooporność powodują, iż retinopatia cukrzycowa

jest jedną z głównych przyczyn ślepoty ludzi aktywnych zawodowo [7]. Według literatury całkowita utrata widzenia dotyka co 10 pacjenta z rozpoznaniem DR [8].

Wyróżnia się dwa typy retinopatii cukrzycowej- nieproliferacyjną (ang. *Nonproliferative diabetic retinopathy* – NPDR) oraz proliferacyjną retinopatię cukrzycową (ang. *Proliferative diabetic retinopathy* – PDR). NPDR dzielimy na: łagodną, umiarkowaną i ciężką. W łagodnym stopniu wyróżnia się jedynie mikrotętniaki, w stopniu umiarkowanym więcej niż mikrotętniaki, a stopień ciężki charakteryzuje się występowaniem któregośkolwiek z powyższych objawów- krwotoczków śródsiatkówkowych (≥ 20 w każdym kwadrancie), przewężeń naczyń żylnych (co najmniej w 2 kwadrantach), śródsiatkówkowych nieprawidłowości naczyniowych (co najmniej w 1 kwadrancie) oraz jednoczasowym brakiem cech proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej [9].

PDR charakteryzuje się objawami typowymi dla ciężkiej nieproliferacyjnej retinopatii cukrzycowej oraz 1 lub więcej z wymienionych: neowaskularyzacją, krwawieniem doszklistkowym lub przedsiatkówkowym [9]. Według wytycznych Amerykańskiej Akademii Okulistyki (ang. *American Academy of Ophthalmology*- AAO) proliferacyjna retinopatia cukrzycowa wysokiego ryzyka charakteryzuje się jednym z powyższych:

- nowotwórstwem naczyniowym na tarczy i przy tarczy nerwu wzrokowego (ang. *Neovascularization of the disc*- NVD) większym niż 1/4 do 1/3 rozmiaru tarczy
- każdym NVD wraz z krwotokiem przedsiatkówkowymdoszklistkowym
- każdym nowotwórstwem nasiatkówkowym obwodowym (ang. *Neovascularization elsewhere*- NVE) wraz z krwotokiem przedsiatkówkowym lub doszklistkowym [10]

Cukrzycowy obrzęk płamki może występować niezależnie lub współwystępować z każdą formą retinopatii cukrzycowej.

1.2 Retinopatia cukrzycowa- patofizjologia

Mechanizmy powstawania cukrzycowych zmian na dnie oka są przedmiotem wieloletnich badań, pomimo to patofizjologia retinopatii cukrzycowej pozostaje nadal nie do końca wyjaśniona. Wyróżnia się kilka możliwych szlaków patogenezы choroby.

Pierwszym etapem patofizjologii retinopatii cukrzycowej jest hiperglikemia. Nieprawidłowy poziom glukozy uszkadza barierę krew-siatkówka i doprowadza do przecieku krwi z naczyń do głębokich warstw siatkówki. Proces ten prowadzi do lokalnego niedokrwienia siatkówki i aktywacji czynników pobudzających neowaskularyzację.

Hipoksja i hiperglikemia warunkują rozwój cukrzycowych zmian na dnie oka poprzez oddziaływanie na różnorodne procesy. Wzrost aktywności szlaku sorbitolu, zwiększenie nieenzymatycznej glikacji białek, wzrost aktywności szlaku diacyloglicerolu i kinazy białkowej C, nadprodukcja czynników wzrostu (głównie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego- (ang. *Vascular endothelial growth factor*- VEGF) i insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1), zmiany hemodynamiczne, nasilenie stresu

oksydacyjnego, aktywacja układu renina-angiotensyna-aldosteron, subkliniczne zapalenie wraz z leukostazą- to prawdopodobnie mechanizmy rozwoju retinopatii cukrzycowej, zależne od zmniejszonego przepływu krwi i nieprawidłowej glikemii [11]. Kinaza białkowa C, nadmierna aktywność VEGF, wzrost ilości i przylegania leukocytów do komórek śródbłonna naczyniowego, łącząc ze sobą większość wymienionych wyżej szlaków, wpływają na rozwój retinopatii cukrzycowej.

1.3 Diagnostyka retinopatii cukrzycowej- złoty standard oraz nowoczesne technologie

Diagnostyka i obserwacja progresji zmian siatkówkowych u pacjentów z cukrzycą oparta jest na rutynowym badaniu dna oka w lampie szczelinowej. Przesiewowym zabiegiem są też zdjęcia, wykonywane przy pomocy fundus kamery.

Do badań dodatkowych, przydatnych w diagnostyce zmian cukrzycowych siatkówki, zaliczamy optyczną koherentną tomografię (ang. *Optical coherence tomography*-OCT), angiografię fluoresceinową oraz optykę adaptacyjną.

Złotym standardem diagnostycznym w cukrzycowym obrzęku płamki jest badanie OCT. OCT w domenie spektralnej (ang. *Spectral domain optical coherence tomography*-SD-OCT) pozwala na dokładną ocenę struktury zewnętrznych warstw siatkówki- błony granicznej zewnętrznej, fotoreceptorów, nabłonka barwnikowego. Polaryzacyjna optyczna koherentna tomografia (ang. *Polarization-sensitive optical coherence tomography*- PS-OCT) umożliwia precyzyjną ewaluację stanu nabłonka barwnikowego (ang. *Retinal pigment Epithelium*- RPE).

Bardzo dokładnym narzędziem diagnostycznym, oceniającym dno oka u pacjentów cukrzycowych, jest angiografia fluoresceinowa (ang. *Fluorescein angiography*-FA). Badanie obrazuje przesieki i krwotoki jako ogniska hiperfluorescencyjne. Angiografię charakteryzuje inwazyjność, związana z ryzykiem wystąpienia powikłań ogólnych.

Nową technologią, stosowaną do oceny zmian naczyniowych w retinopatii cukrzycowej, jest angiografia optycznej koherentnej tomografii- angio-OCT (ang. *Optical coherence tomography angiography*- OCTA). W odróżnieniu od standardowej angiografii fluoresceinowej, OCTA jest nieinwazyjnym, łatwym do wykonania badaniem, niewymagającym użycia dożylnego środka kontrastującego.

Angio-OCT obrazuje przepływ krwi w powierzchniowym i głębokim splocie naczyniowym, na poziomie warstw zewnętrznych siatkówki oraz w choriokapilarach [12]. OCTA pozwala uwidocznić zmiany typowe dla retinopatii cukrzycowej, takie jak mikrotętniaki, śródsiatkówkowe nieprawidłowości oraz proliferacje naczyniowe. Ponadto, angiografia optycznej koherentnej tomografii umożliwia pomiar średniego pola powierzchni dołkowej strefy beznaczyniowej (*foveal avascular zone* – FAZ), ulegającej powiększeniu w przebiegu DR.

Komplementarną technologią, która znalazła zastosowanie w prewencji i obserwacji retinopatii cukrzycowej, jest optyka adaptacyjna (ang. *Adaptive optics*- AO). AO wykorzystuje system lustro z plastyczną powierzchnią, modelowaną za pomocą czujników elektromagnetycznych, a zmiana kształtu zwierciadła pozwala na niwelację aberracji czoła fali w trakcie przeprowadzania badania [13].

Jednym z urządzeń, wykorzystujących innowacyjną metodę AO, jest aparat rtx1TM (Imagine Eyes, Orsay, France). Rtx1TM używa wiązkę światła podczerwieni (o długości fali 850nm) i jest najdokładniejszym urządzeniem, obrazującym siatkówkę z rozdzielczością wynoszącą 1,6 μm [14].

Zdjęcie uzyskane za pomocą kamery rtx1TM obejmuje pole $4^\circ \times 4^\circ$, odpowiadające kwadratowi na siatkówce o wymiarze około 1.2 μm x 1.2 μm . Czas akwizycji jednego obrazu wynosi 4 sekundy, a wykonanie pełnego badania zajmuje od kilku do kilkunastu minut, co zależy od badanego obszaru, doświadczenia użytkownika aparatu oraz współpracy pacjenta [15].

Czynnikami warunkującymi jakość wykonanych zdjęć jest wielkość źrenicy oraz przezierność ośrodków optycznych. Minimalna szerokość źrenicy, umożliwiająca pomiar, wynosi 4mm, dlatego często akwizycja obrazu wymaga zastosowania mydriazy lub pracy w warunkach słabego oświetlenia. Towarzyszące choroby okulistyczne takie jak: zaćma, choroby rogówki (blizny, obrzęk, zmiany dystroficzne), zmętnienia ciała szklonego, choroby siatkówki (krwotoki, płyn podsiatkówkowy) wpływają na jakość obrazu i możliwość wystąpienia artefaktów [13]. Ważnym elementem badania jest ostrość wzroku pacjenta i współpraca w trakcie akwizycji zdjęć. Nieprawidłowa ostrość wzroku ogranicza odpowiednią fiksację oraz uniemożliwia zdolność jej utrzymania, co niekorzystnie wpływa na jakość otrzymanych obrazów.

Rtx1TM w sposób szybki i nieinwazyjny ocenia mikrostrukturę siatkówki- pojedyncze fotoreceptory, blaszkę sitową, mikrokrwotoki, mikroprzesięki, depozyty, obszary zanikowe siatkówki. Oprogramowanie urządzenia dokonuje analizy zobrazowanych komórek i pozwala stworzyć mapy gęstości i rozmieszczenia fotoreceptorów. Pomiarzy znajdują zastosowanie w licznych chorobach siatkówki, takich jak: zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, zespół Ushera, choroba Stargarda, dystrofia czopków, achromatopsja, choroba Besta, dystrofia Biettiego, chorioideremia [13]. Ponadto analiza fotoreceptorów jest pomocna w diagnostyce i obserwacji progresji zmian polekowych- retinopatii hydroksycholorochinowej czy talkowej [16,17], a także zmian poporomiennych [18].

Aparat jest przydatnym narzędziem do precyzyjnej oceny parametrów naczyniowych. Analiza zdjęć wykonanych przy pomocy rtx1TM pozwala obliczyć z dużą dokładnością średnicę, grubość ścian naczyń, co może być przydatne nie tylko w monitorowaniu cukrzycy, ale także innych chorób przewlekłych, takich jak nadciśnienie czy choroby zapalne naczyń.

Aparat rtx1TM obrazuje zmiany morfologii siatkówki, zachodzące na bardzo wczesnym etapie retinopatii cukrzycowej, niemożliwe do uchwycenia przy pomocy żadnej innej technologii. Zdjęcia wykonane tym urządzeniem pozwalają uwidocznić mikrotętniaki, mikroskopowe krwotoczki, komórki krwi, a także mikrostrukturę wysięków twardych [19].

Analiza mikrowaskulatury siatkówki, precyzyjne obrazowanie mozaiki pojedynczych komórek siatkówki wraz z oceną ich gęstości i regularności służą do oceny progresji retinopatii cukrzycowej. Badania udowodniły skuteczność aparatu rtx1TM w uwidocznieniu zmian na poziomie mikronaczyniowym i fotoreceptorowym zarówno w cukrzycy bez cech retinopatii cukrzycowej, jak i w stanie przedcukrzycowym [20,21]. Zatem wczesna diagnostyka nieprawidłowości siatkówkowych przy pomocy optyki

adaptywnej może przyczynić się do intensyfikacji leczenia i zapobiec dalszej progresji choroby.

1.4 Retinopatia cukrzycowa- terapia

Podstawową metodą leczenia retinopatii cukrzycowej jest utrzymywanie prawidłowego poziomu glikemii. Wczesna intensyfikacja leczenia hipoglikemizującego zmniejsza zarówno ryzyko progresji zmian na dnie oka, jak i powikłań wielonarządowych. Rekomendacje Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego (ang. *American Diabetes Association- ADA*) zalecają utrzymanie poziomu hemoglobiny glikowanej (HbA1c) poniżej 7%; według ADA zalecany poziom może podlegać modyfikacjom, uwzględniając indywidualne czynniki ryzyka pacjenta [22].

Uważa się, iż monitorowanie ciśnienia tętniczego oraz parametrów lipidowych krwi odgrywa ważną rolę w prewencji rozwoju i progresji retinopatii cukrzycowej.

Wiele badań miało na celu znalezienie mechanizmu ochronnego działania prawidłowego ciśnienia tętniczego na patofizjologię DR w czasie trwania cukrzycy. W analizie *United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)* udowodniono wpływ obniżenia skurczowego ciśnienia tętniczego o 10 mm Hg na zmniejszenie ryzyka mikroangiopatii, w tym retinopatii, o 13% [23]. Natomiast w 2015 roku Do i inni wykazali, że kontrola ciśnienia tętniczego bez innych metod terapeutycznych nie zmniejsza ryzyka rozwoju i progresji retinopatii cukrzycowej [24]. Pomimo to uważa się, iż prawidłowe ciśnienie tętnicze krwi odgrywa ważną rolę w przeciwdziałaniu degeneracji śródbłonna naczyń, ograniczając wystąpienie mikrowaskularnych powikłań cukrzycy [24].

Wpływ poziomu lipidów na rozwój retinopatii cukrzycowej jest również kontrowersyjny i złożony. Badanie przeprowadzone w 2001 roku (ang. *Collaborative Atorvastatin Diabetes Study and the Heart Protection Study*) [25] sprawdzało znaczenie atorwastatyny w patogenezie chorób sercowo- naczyniowych w grupie pacjentów z cukrzycą. Udowodniono brak wpływu stosowania statyn na progresję retinopatii cukrzycowej.

W 2003 roku Cusic i inni zaprezentowali odmienne wyniki. Dowiedli, że zwiększenie stężenia cholesterolu o 10% powoduje przyrost liczby wysięków twardych w siatkówce, a na ich zanik wpływa terapia statynami, a nie jak wcześniej uważano fotokoagulacja siatkówki [15].

Znamienną korelację pomiędzy poziomem lipidów a rozwojem zmian cukrzycowych udowodniono również w innych analizach. Badanie Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular-genetics Study (SN-DREAMS II) przeprowadzone w 2017 roku wykazało, iż podwyższony poziom trójglicerydów zwiększa istotnie ryzyko rozwoju PDR [26].

W terapii retinopatii cukrzycowej rutynowo stosuje się fotokoagulację siatkówki oraz iniekcje doszkliskowe przeciwciał anti-VEGF. Zastosowanie lasera- zarówno argonowego, jak i ksenowego- jest powszechne w leczeniu PDR. Fotokoagulacja siatkówki hamuje progresję choroby, zmniejszając ryzyko ślepoty. Niestety nie jest

pozbawiona działań niepożądanych, takich jak zawężenie pola widzenia, pogorszenie widzenia nocnego oraz występowanie mroczków w polu widzenia [27].

Terapią pierwszego rzutu cukrzycowego obrzęku plamki są preparaty anti-VEGF- aflibercept, ranibizumab, zarejestrowane i dopuszczone w Polsce w terapii DME i PDR, natomiast bevacyzumab jest stosowany „off-label”- na własną odpowiedzialność lekarza. Opierając się na licznych badaniach [28, 29] Amerykańska Agencja do spraw Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*- FDA) rozszerzyła rejestrację afliberceptu o leczenie NPDR. Protokół W DRCCR.net nie udowodnił wpływu iniekcji z zastosowaniem afliberceptu na poprawę ostrości wzroku w umiarkowanej do ciężkiej NPDR [30]. Co więcej, terapia może doprowadzić do wzrostu ciśnienia i/lub zapalenia wnętrza gałki ocznej. Dlatego standardem leczenia nieproliferacyjnej retinopatii pozostaje obserwacja i kontrola ogólnego stanu zdrowia pacjenta.

W 2022 roku Komisja Europejska zatwierdziła dwa nowe leki w terapii DME- brolicizumab i faricimab. Brolicizumab to humanizowany jednołańcuchowy fragment przeciwciała monoklonalnego. Lek ma bardzo małą cząsteczkę, co zwiększa penetrację podsiatkówkową. Faricimab jest monoklonalnym przeciwciałem o wielotorowym działaniu. Specyfika leku polega na hamowaniu czynnika VEGF, angiopoetyny oraz kinazy tyrozyny; synergizm blokowania angiopoetyny 2 oraz VEGF-A zapewnia lepszą stabilność naczyniową oraz zmniejsza ryzyko przecieku naczyniowego [31]. Skuteczność nowych preparatów doszklistkowych jest porównywalna ze standardowymi. Innowacyjność tych substancji polega na wydłużonym interwale czasowym pomiędzy iniekcjami, co może zmniejszyć działania niepożądane związane z formułą podania leku.

Trwają badania nad innymi, bardziej trwałymi doszklistkowymi preparatami. Pozytywne doniesienia co do skuteczności dotyczą wysokich dawek afliberceptu (8mg) czy terapii genowej, czynnikami takimi jak RGX-314 i ADVM-022. Bezpieczeństwo długotrwałej terapii będzie oceniane w dalszych badaniach.

Podawanie steroidów do ciała szklistego jest rzadziej używaną metodą farmakoterapii retinopatii cukrzycowej. Potencjalny wzrost ciśnienia wewnątrzgałkowego oraz wpływ na tworzenie się zmętnień w soczewce ograniczają użyteczność terapii sterydowej. Triamcynolon jest podawany do komory ciała szklistego „off-label” w przypadku nieskuteczności terapii laserowej w rozlanym obrzęku plamki żółtej. Zarejestrowane do leczenia DME biodegradowalne implanty, uwalniające doszklistkowo dexamethason oraz fluocynolon, są alternatywą dla triamcynolonu. Wieloośrodkowe, perspektywne, randomizowane badania nie wykazały wyższości steroidów nad terapią anti-VEGF [25]. Według przeprowadzonych analiz stosowanie acetonidu fluocynolonu ma przewagę terapeutyczną nad przeciwciałami anti-VEGF w leczeniu przewlekłego DME [32]. Ze względu na zwiększoną trwałość preparatu, doszklistkowe implanty steroidowe znalazły zastosowanie w leczeniu cukrzycowego obrzęku plamki w grupie pacjentów po witrektomii.

1 lipca 2021 roku Ministerstwo Zdrowia wprowadziło w życie program lekowy leczenia cukrzycowego obrzęku plamki żółtej, którego podstawą jest lek z grupy przeciwciał anti-VEGF- bevacyzumab (Avastin). W przypadku udokumentowanego braku skuteczności terapii pierwszego rzutu można zastosować doszklistkowe iniekcje z użyciem afliberceptu, ranibizumabu lub deksametazon w postaci implantu doszklistkowego. W 2022 roku Komisja Europejska zatwierdziła faricimab (Vabysmo) do leczenia neowaskularnego zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (ang. *Age-related macular degeneration*- AMD) oraz DME, prawdopodobnie będzie on kolejnym lekiem zatwierdzonym do ministerialnego programu leczenia DME.

Chirurgia retinopatii cukrzycowej oparta jest przede wszystkim na witrektomii. Zabieg ma zastosowanie w terapii PDR; wskazania do operacji obejmują:

- niewchłaniający się krwotok doszklistkowy
- nawracający krwotok doszklistkowy
- trakcyjne odwarstwienie siatkówki zagrażające plamce żółtej, trakcyjno-przedarciove odwarstwienie siatkówki
- gęsty krwotok przedplamkowy
- jaskrę cieni komórek
- neowaskularyzację przedniego odcinka oka w oku z nieprzeziernymi ośrodkami optycznymi

W teorii usunięcie ciała szklistego przyczynia się do zwiększenia: oksygenacji siatkówki, wewnątrzgałkowego obrotu cytokin i dostępności leków podanych doszklistkowo [25].

Zasadność witrektomii w przypadku DME pozostaje kontrowersyjna. Liczne badania analizowały efekty zabiegu w grupie pacjentów z opornym, niepodlegającym leczeniu DME. Wyniki udowodniły skuteczność witrektomii w zmniejszeniu grubości siatkówki w obszarze plamkowym z niewspółmiernie mniejszą poprawą ostrości wzroku [33,34]. Pomimo pozytywnego wpływu na stan siatkówki, witrektomia jest jedynie alternatywną terapię DME wymagającą weryfikacji w dalszych randomizowanych badaniach.

Świat medycyny szuka innowacyjnych możliwości leczenia powikłań cukrzycowych. Założenia nowych, potencjalnych metod terapeutycznych retinopatii cukrzycowej opierają się na minimalizacji działań niepożądanych oraz jak największej skuteczności leków.

Terapia genowa, leczenie z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych, terapia antyoksydantami (np. kurkumina) czy N-acetylocysteiną- to przykłady innowacyjnego postępowania w leczeniu cukrzycowych zmian na dnie oka [35,36,37,38]. Wiele z nich daje nadzieję na szybką i skuteczną strategię terapeutyczną retinopatii cukrzycowej, ale wymienione metody wymagają dodatkowej weryfikacji, celem oceny ich skuteczności i bezpieczeństwa.

2. Cel pracy

Praca doktorska ma strukturę spójnego tematycznie zbioru artykułów, dotyczących diagnostyki, monitorowania oraz terapii zmian morfologicznych siatkówki w czasie trwania cukrzycy.

Głównym narzędziem, służącym do oceny zmian morfologii siatkówki, zastosowanym w pracy, była technologia optyki adaptywnej z zastosowaniem aparatu rtx1™.

Celem pracy jest:

- 1) omówienie patofizjologii retinopatii cukrzycowej
- 2) analiza korelacji morfologii siatkówki z wartością wskaźnika masy ciała (ang. *Body mass index*- BMI) – badania z zastosowaniem techniki optyki adaptywnej
- 3) ocena zmian morfologii siatkówki w czasie trwania cukrzycy przy pomocy technik optyki adaptywnej
- 4) analiza korelacji zmian morfologii siatkówki ze zmianą ostrości wzroku i centralnej grubości siatkówki w czasie trwania cukrzycy
- 5) omówienie metod leczenia retinopatii cukrzycowej

2.1 Artykuł: “Introduction to pathophysiology of diabetic retinopathy”

Na całym świecie obserwowany jest lawinowy wzrost zachorowalności na cukrzycę. Trend ten przyczynia się do rozpowszechnienia groźnych powikłań choroby, w tym retinopatii cukrzycowej.

Retinopatia cukrzycowa stanowi główną przyczyną utraty wzroku w grupie ludzi aktywnych zawodowo, w szczególności w krajach rozwiniętych.

Patofizjologia uszkodzenia siatkówki w toku trwania choroby charakteryzuje się znaczną złożonością, dlatego stała się przedmiotem licznych badań i publikacji. Celem artykułu było opisanie mechanizmów rozwoju choroby wraz z analizą możliwych zależności między poszczególnymi szlakami patogenezy.

Badanie patofizjologii retinopatii cukrzycowej może służyć opracowaniu skutecznej terapii choroby.

Praca pogładowa.



Wprowadzenie do patofizjologii retinopatii cukrzycowej

Magdalena Kupis^{1,2}, Katarzyna Samelska^{1,2}, Anna Zaleska-Żmijewska^{1,2}, Jacek Szaflik^{1,2}

¹Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny w Warszawie

²Katedra i Klinika Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

STRESZCZENIE

W ostatnich latach obserwuje się systematyczny wzrost zachorowalności na cukrzycę. Retinopatia cukrzycowa – powikłanie mikronaczyniowe cukrzycy – jest jedną z głównych przyczyn ślepoty w grupie wiekowej ludzi aktywnych zawodowo. Patofizjologia retinopatii cukrzycowej jest bardzo złożona. Jedną z pierwszych obserwowanych zmian w retinopatii cukrzycowej jest zmniejszony siatkówkowy przepływ krwi. Hipoksja i hiperglikemia przyczyniają się do rozwoju retinopatii cukrzycowej w kilku następujących mechanizmach: wzrost aktywności szlaku sorbitolu, zwiększenie nieenzymatycznej glikacji białek, wzrost aktywności szlaku diacy-

loglicerolu i kinazy białkowej C, nadprodukcja czynników wzrostu (głównie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego – VEGF i insulinopodobnego czynnika wzrostu – IGF-1), zmiany hemodynamiczne, nasilenie stresu oksydacyjnego, aktywacja układu renina-angiotensyna-aldosteron, subkliniczne zapalenie wraz z leukostazą. W patofizjologii retinopatii cukrzycowej istotną rolę odgrywają zmiany neurodegeneracyjne. Analiza wymienionych w artykule szlaków patogenez retinopatii cukrzycowej może służyć opracowaniu skutecznej terapii zmian cukrzycowych na dnie oka.

SŁOWA KLUCZOWE: retinopatia cukrzycowa, kinaza białkowa C, VEGF, leukostaza, zmiany neurodegeneracyjne

WSTĘP

W ostatnich latach na całym świecie obserwuje się systematyczny wzrost zachorowalności na cukrzycę, a chorobie tej przypisuje się miano globalnej epidemii. W 2015 r. Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna oszacowała, iż w ciągu 25 lat liczba chorych na cukrzycę wzrośnie z 415 milionów do 642 milionów w roku 2040 [1]. Według danych Narodowego Funduszu Zdrowia w 2018 r. w Polsce chorowało na cukrzycę 2,86 miliona dorosłych Polaków [2].

Retinopatia cukrzycowa jest jednym z głównych powikłań mikronaczyniowych cukrzycy. W związku ze słabą kontrolą glikemii oraz rosnącą insulinoopornością retinopatia cukrzycowa staje się główną przyczyną ślepoty w grupie wiekowej ludzi aktywnych zawodowo [3]. Wyróżnia się dwa typy retinopatii cukrzycowej – nieproliferacyjną (*nonproliferative diabetic retinopathy* – NPDR) oraz proliferacyjną (*proliferative diabetic retinopathy* – PDR), charakteryzującą się neowaskularyzacją siatkówkową. Głównym czynnikiem wpływającym na progresję retinopatii jest czas trwania choroby. Według badań epidemiologicznych – 20 lat po rozpoznaniu choroby u prawie wszystkich pacjentów z cukrzycą typu 1 i u około 80% pacjentów z cukrzycą typu 2 zaobserwowano zmiany o charakterze retinopatii cukrzycowej [4].

Patofizjologia zmian cukrzycowych na dnie oka jest bardzo złożona i pomimo wieloletnich badań nie do końca wyjaśniona. Zmniejszony siatkówkowy przepływ krwi zaobserwowany już w początkowej fazie choroby, zmiany neurodegeneracyjne, zmiany o charakterze zapalnym, leukostaza, okluzja naczyń prowadzą do niedotlenienia oraz dalszej progresji choroby [5]. Tak w uproszczeniu można przedstawić patogenezę zmian zachodzących w retinopatii cukrzycowej.

HIPOKSJA I HIPERGLIKEMIA

Jedną z pierwszych zmian, jaką obserwuje się w retinopatii cukrzycowej, jest zmniejszony siatkówkowy przepływ krwi. Już w początkowej fazie choroby dochodzi do zaburzeń krążenia kapilarnego siatkówki. Zmiany te można zaobserwować za pomocą laserowej techniki Dopplera, a także wideo angiografii fluoresceinowej [6, 7]. Dochodzi do hipoperfuzji siatkówkowej i hipoksji.

Hipoksja i hiperglikemia przyczyniają się do rozwoju retinopatii cukrzycowej w kilku następujących mechanizmach: wzrost aktywności szlaku sorbitolu, zwiększenie nieenzymatycznej glikacji białek, wzrost aktywności szlaku diacyloglicerolu (DAG) i kinazy białkowej C (*protein kinase C* – PKC), nadprodukcja czynników wzrostu (czynnik wzro-

ADRES DO KORESPONDENCJI

Ilek. Magdalena Kupis, Katedra i Klinika Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. W. Lindleya 4, 02-005 Warszawa, e-mail: magdalennakupis@gmail.com

stu śródbłonka naczyniowego, *vascular endothelial growth factor* – VEGF i insulinopodobny czynnik wzrostu, *insulin-like growth factor* – IGF-1), zmiany hemodynamiczne, nasilenie stresu oksydacyjnego, aktywacja układu renina–angiotensyna–aldosteron, subkliniczne zapalenie wraz z leukostazą [8].

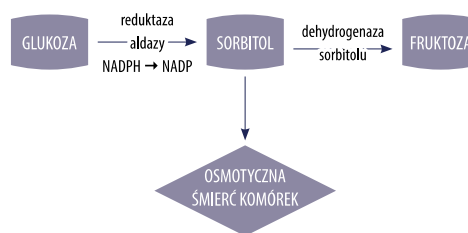
SZLAK SORBITOLU

W cukrzycy nadmiar glukozy ulega przekształceniu w dwuetapowym szlaku sorbitolu (rycina 1, [8]). W komórkach siatkówki reduktaza aldolowa (*aldose reductase* – AR) redukuje glukozę do sorbitolu, którego później dehydrogenaza sorbitolu (*succinate dehydrogenase* – SDH) przekształca we fruktozę. Sorbitol jest nieprzepuszczalny dla błon komórkowych, zostaje akumulowany w nadmiarze i doprowadza do osmotycznego uszkodzenia komórek [9]. Zwiększenie utleniania NADPH⁻ (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego) do NADP⁺ oraz redukcji NAD⁺ do NADH doprowadza do niedotlenienia tkanek. Stan taki nazywany jest pseudohipoksją hiperglikemiczną [10].

Nadaktywność szlaku sorbitolu próbowano wykorzystać w farmakoterapii retinopatii cukrzycowej. Badanie przeprowadzone na szczurach karmionych galaktozą pokazały, iż inhibitory reduktazy aldolowej (*aldose reductase inhibitors* – ARI) zmniejszają częstość i zaawansowanie cukrzycowych zmian siatkówkowych [11]. Skuteczność sorbinilu (jednego z ARI) w leczeniu retinopatii cukrzycowej pozostaje jednak wątpliwa [12]. Wydaje się, iż ograniczona efektywność tego leku może wynikać ze zbyt słabej inhibicji szlaku sorbitolowego w ludzkiej tkance w porównaniu z tkankami zwierzęcymi [12]. Trwają badania nad wykorzystaniem innych niż sorbinil ARI w profilaktyce i zmniejszeniu progresji retinopatii cukrzycowej. Wyniki będą znane w niedalekiej przyszłości.

NIEENZYMATYCZNA GLIKACJA BIAŁEK

W naszym ciele dochodzi do reakcji między resztami aminowymi białek, lipidów, kwasów nukleinowych z grupą aldehydową glukozy, czyli nieenzymatycznej glikacji. W normalnych warunkach proces ten zachodzi powoli i końcowe produkty glikacji (*advanced glycation end-products* – AGEs) gromadzą się w czasie. W cukrzycy w wyniku nadmiaru dostępności glukozy dochodzi do zwiększonej produkcji AGEs i ich nadmiernej akumulacji. Nadmierna produkcja AGEs przyczynia się do rozwoju retinopatii cukrzycowej w kilku mechanizmach. Jednym z nich jest odkładanie się produktów AGEs w macierzy, błonie podstawnej i ścianie naczyń krwionośnych [8]. Innym mechanizmem jest interakcja AGEs z receptorami na ścianie błon komórkowych, np. receptorem zaawansowanych produktów glikacji (*receptor for advanced glycation end-products* – RAGEs), receptorem galektyny-3, CD36 oraz receptorami zmiataczami, co przyczynia się do aktywacji stanu zapalnego [13, 14]. Powstałe kompleksy AGE–receptor doprowadzają do dysfunkcji komórek. Kompleks AGE-RAGE na błonie komórek śródbłonka pobudza ich proliferację, zwiększa ich przepuszczalność oraz przyczynia się do powstawania zakrzepów [15–17].



Rycina 1. Szlak sorbitolu

Prowadzono liczne badania kliniczne oceniające skuteczność inhibitorów nieenzymatycznej glikacji w leczeniu retinopatii cukrzycowej. Stosowanie inhibitora produkcji AGEs, jakim jest chlorowodorek aminoguanidyny, zmniejszyło patologię w obrębie naczyń krwionośnych – uszkodzenie perycytów, bezkomórkowość naczyń włosowatych czy tworzenie mikrotętniaków [13].

SZLAK DIACYLOGLICEROLU I KINAZY BIAŁKOWEJ C

W patogenezie retinopatii cukrzycowej kluczową rolę odgrywa także szlak DAG i PKC. W cukrzycy, w warunkach nadmiaru glukozy DAG jest syntezowany z produktów pośrednich glikolizy: fosfodihydroksyacetonu (*dihydroxyacetone phosphate* – DHAP) i gliceraldehydo-3-fosforanu [18]. W wyniku nadmiaru DAG u pacjentów z cukrzycą dochodzi do zwiększonej aktywności PKC. Kinaza białkowa C jest zaangażowana w wiele fizjologicznych procesów. Zwiększona aktywność PKC wpływa na rozwój retinopatii cukrzycowej m.in. na skutek zwiększonej produkcji białek macierzy pozakomórkowej, zwiększonej przepuszczalności i proliferacji komórek śródbłonka, skurczu komórek mięśni gładkich, leukostazy, aktywacji VEGF, upośledzenia siatkówkowego przepływu krwi [8].

W badaniach eksperymentalnych i klinicznych sprawdzano skuteczność dobrze tolerowanego inhibitora PKC, jakim jest ruboksytauryna. Udowodniono, że lek ten nie przynosi korzyści w prewencji retinopatii cukrzycowej [19]. Według badań klinicznych u pacjentów objawowych (zwłaszcza tych, z cukrzycowym obrzękiem płamki) ruboksytauryna może przyczynić się jednak do istotnej poprawy ostrości wzroku i zmniejsza potrzebę laserowej fotokoagulacji siatkówki [19, 20].

CZYNNIKI WZROSTU

Innym istotnym mechanizmem rozwoju retinopatii cukrzycowej jest wzrost aktywności czynników wzrostu. Najbardziej przebadanym pod kątem wpływu na rozwój retinopatii jest VEGF. Wspominano już w artykule o tym, że jego aktywacja następuje w wyniku działania PKC. Czynniki wzrostu

śródbłonna naczyniowego przyczynia się do załamania bariery krew–siatkówka, zwiększa przepuszczalność naczyń, stymuluje proliferację komórek śródbłonna naczyń i neowaskularyzację [21–23]. W tych mechanizmach wywołuje nasiloną angiogenezę siatkówkową. W Polsce doszklitkowe iniekcje leków antyneowaskularyzacyjnych (aflibercept, bewacyzumab, ranibizumab) są powszechnie stosowane w leczeniu powikłań retinopatii cukrzycowej. Niestety, coraz częściej przypisuje się tym substancjom działanie neurodegeneracyjne. W badaniu Hombrebueno długotrwałe podawanie anty-VEGF cierpiącym na cukrzycę myszom wywołało uszkodzenie fotoreceptorów, komórek amakrynowych, komórek zwojowych siatkówki oraz połączeń synaptycznych [24].

W patogenezie retinopatii cukrzycowej biorą udział również inne czynniki wzrostu, np. czynnik wzrostu fibroblastów (*fibroblast growth factor* – FGF), IGF-1, płytkopochodny czynnik wzrostu (*platelet-derived growth factor* – PDGF) [8]. Mechanizm wpływu wyżej wymienionych czynników na rozwój retinopatii cukrzycowej nie jest do końca poznany, dlatego też ich inhibitory nie są wykorzystywane w leczeniu powikłań cukrzycy.

Zmiany hemodynamiczne w postaci nadciśnienia tętniczego oraz aktywacja układu renina-angiotensyna-aldosteron mają istotny wpływ na rozwój retinopatii cukrzycowej. Wysokie ciśnienie krwi uszkadza komórki śródbłonna naczyń oraz zwiększa aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron [8].

UKŁAD RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERON

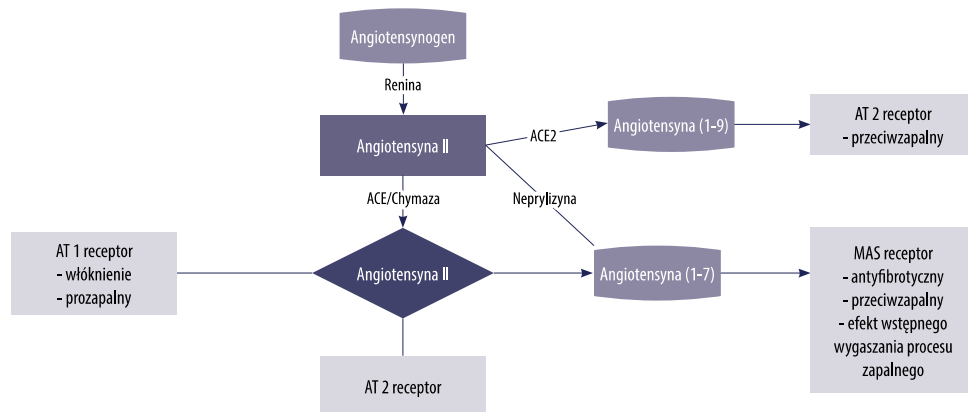
W proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej udowodniono podwyższoną aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron, a zwłaszcza reniny, enzymów konwertujących – ACEI (*angiotensin-converting-enzyme inhibitors*) i ACEII, receptorów dla angiotensyny [25, 26]. Mechanizm wpływu układu RAAS (*renin-angiotensin-aldosterone system*) na rozwój

siatkówkowych zmian cukrzycowych nie jest pewny. W piśmiennictwie mowa o oddziaływaniu angiotensyny II z PKC i VEGF [27]. Na podstawie eksperymentalnego badania na myszach udowodniono związek między produktem degradacji angiotensyny II – Ang 1-7 a retinopatią cukrzycową [28]. Ang 1-7 hamuje siatkówkową proteinową O-GlcNAcylicację, tym samym zmniejsza ryzyko rozwoju zmian cukrzycowych na dnie oka [2]. Wykorzystanie tego mechanizmu w terapii retinopatii cukrzycowej może stać się alternatywą dla ACE-inhibitorów i blokerów receptora angiotensyny (*angiotensin receptor blockers* – ARBs) (rycina 2, [33]).

LEUKOSTAZA

Już kilka tygodni od początku cukrzycy dochodzi do zjawiska zwanego leukostazą. Leukocyty ściśle przylegają do komórek śródbłonna naczyniowego i doprowadzają do zablokowania drobnych naczyń, zmniejszenia przepływu krwi i lokalnego niedokrwienia [29]. W cukrzycy dochodzi do zwiększonego stężenia cytokin prozapalnych, cząstek adhezyjnych, co przyciąga leukocyty i wpływa na reakcje leukocytów z komórkami śródbłonna [29]. Badania udowodniły, że poziom leukocytów, cytokin prozapalnych i czynników adhezyjnych koreluje ze stopniem progresji retinopatii cukrzycowej [31].

Próbowano wykorzystać mechanizm przeciwwapalny w farmakoterapii retinopatii cukrzycowej. Iniekcje doszklitkowe steroidów (triamcinolonu) czy niesteroidowych leków przeciwwapalnych (nepafenaku) są skuteczne w zmniejszaniu objawów retinopatii cukrzycowej, zwłaszcza w jej zaawansowanych stadiach, ale wiążą się z ryzykiem działań niepożądanych typowych dla iniekcji doszklitkowych, np. jaskrą, zapaleniem wnętrza gałki ocznej [31]. Najbardziej pożądaną formą leków i dającą najmniej powikłań ogólnoustrojowych lub groźnych dla funkcji widzenia jest forma kroplowa.



Rycina 2. Układ renina-angiotensyna-aldosteron

W Polsce powszechnie stosowanym lekiem w formie kroplowej jest nepafenak, który charakteryzuje się dużą skutecznością w leczeniu cukrzycowego obrzęku plamki żółtej [34].

STRES OKSYDACYJNY

Kolejnym mechanizmem patogenezы retinopatii cukrzycowej jest stres oksydacyjny. Odgrywa on kluczową rolę w patofizjologii cukrzycy – w warunkach hiperglikemii i stresu oksydacyjnego dochodzi do nasilonej glikolizy, nadprodukcji NADP i zwiększonego wytwarzania wolnych rodników tlenowych (*reactive oxygen species* – ROS) [10]. W badaniach eksperymentalnych na szczurach z cukrzyką wykryto podwyższony poziom wolnych rodników w komórkach siatkówki w porównaniu z grupą kontrolną – szczurów z prawidłowym stężeniem glukozy we krwi [32]. Reaktywne formy tlenu doprowadzają do apoptozy komórek, w tym apoptozy komórek śródbłonna, co skutkuje nasileniem leukostazy. Udowodniono, iż zmniejszenie stresu oksydacyjnego wpływa także na inne mechanizmy istotne w retinopatii cukrzycowej – hamuje szlak sorbitolu, zmniejsza aktywność PKC [10].

ZMIANY NEURODEGENERACYJNE

Na koniec w artykule opisano istotę zmian neurodegeneracyjnych w patogenezie retinopatii cukrzycowej. Według istniejących badań zmiany neurodegeneracyjne – gliozą, zmniejszona aktywność i apoptozą komórek nerwowych siatkówki pojawiają się przed zmianami typu mikroangiopatii cukrzycowej [35–37]. Najbardziej narażone na „zaprogramowaną śmierć” są komórki zwojowe siatkówki i komórki amakrynowe; apoptozie ulegają również fotoreceptory – czopki i pręciki [38].

Do oceny zmian neurodegeneracyjnych w cukrzyicy zastosowanie znalazło badanie metodami optycznej koherentnej tomografii (*optical coherence tomography* – OCT) i multifokalnej elektrotretinografii (*multifocal electroretinography* – mfERG) –

w OCT obserwuje się zmniejszoną grubość włókien nerwowych siatkówki, w mfERG – wydłużoną latencję fali [39].

Potencjalnych mechanizmów apoptozy komórkowej w retinopatii cukrzycowej jest wiele. Do tych najczęściej przytaczanych należy wzmóżona pozakomórkowa akumulacja glutamianu, zmniejszone stężenie czynników przetrwania komórek nerwowych (np. neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego, insuliny, płytkopochodnego czynnika wzrostu), wzmóżony stres oksydacyjny oraz lokalny proces zapalny z leukostazą [40].

Próbowano wykorzystać neurodegeneracyjną teorię w farmakoterapii retinopatii cukrzycowej. Badanie z randomizacją Simó i wsp. (2017) nie udowodniło skuteczności podawanych kroplowo leków neuroprotektynnych (brymonidyn i somatostatyny) w profilaktyce i progresji retinopatii cukrzycowej [41]. Niewykluczone, iż w przyszłości będą prowadzone inne badania wykorzystujące ten mechanizm w leczeniu powikłań cukrzycy.

PODSUMOWANIE

W artykule opisano kilka istotnych szlaków patogenezы retinopatii cukrzycowej. Większość z nich łączy się ze sobą – głównie za sprawą aktywności PKC, wzrostu aktywności VEGF czy leukostazy. Pomimo tego, że świat nauki bada patofizjologię retinopatii cukrzycy od lat i analizuje mechanizmy rozwoju powikłań w jej przebiegu, nie jest znana skuteczna metoda zapobiegania i leczenia, umożliwiająca zapewnienie chorym dobrej ostrości wzroku w długoterminowych obserwacjach. Nadziejemy na odkrycie innowacyjnej, skutecznej terapii retinopatii cukrzycowej być może przyniosą nowe techniki obrazowania siatkówki.

OŚWIADCZENIE

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

1. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y i wsp. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract* 2017; 128: 40-50.
2. ezdrowie. NFZ o zdrowiu. Cukrzyca. Dostępne na: https://ezdrowie.gov.pl/pobierz/nfz_o_zdrowiu_cukrzyca.
3. Dierschke SK, Toro AL, Barber AJ i wsp. Angiotensin-(1-7) attenuates protein O-GlcNAcylation in the retina by EPAC/Rap1-Dependent Inhibition of O-GlcNAc Transferase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2020; 61: 24.
4. Klein R, Klein BR, Moss SE. The Wisconsin epidemiological study of diabetic retinopathy: a review. *Diabetes Metab* 1989; 5: 559-570.
5. Curtis TM, Gardiner TA, Stitt AW. Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis. *Eye (Lond)* 2009; 23: 1496-1508.
6. Fekete GT, Buzney SM, Ogasawara H i wsp. Retinal circulatory abnormalities in type 1 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 2968-2975.
7. Bursell SE, Clermont AC, Shiba T i wsp. Evaluating retinal circulation using video fluorescein angiography in control and diabetic rats. *Curr Eye Res* 1992; 11: 287-295.
8. Tarr JM, Kaul K, Chopra M i wsp. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol* 2013; 2013: 343560.
9. Gabbay KH. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N Engl J Med* 1973; 288: 831-836.
10. Obońska K, Grabczewska Z, Fisz J i wsp. Cukrzyca i dysfunkcja śródbłonna – krótkie spojrzenie na złożony problem. *Folia Cardiologica Excerpta* 2011; 6:109-116.
11. Frank RN, Keirn RJ, Kennedy A i wsp. Galactose-induced retinal capillary basement membrane thickening: prevention by Sorbinil. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 1519-1524.
12. Sun W, Oates PJ, Coucher JB i wsp. A selective aldose reductase inhibitor of a new structural class prevents or reverses early retinal abnormalities in experimental diabetic retinopathy. *Diabetes* 2006; 55: 2757-2762.

13. Hammes HP, Martin S, Federlin K i wsp. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11555-11558.
14. Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2011; 11: 244-252.
15. Stern DM, Yan SD, Yan SF i wsp. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Res Rev* 2002; 1: 1-15.
16. Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect* 2004; 6: 1219-1225.
17. Hu FB, Stamper MJ, Haffner SM. Elevated risk of cardiovascular disease prior to clinical diagnosis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 1129-1134.
18. Way KJ, Katal N, King GL. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med* 2001; 18: 945-959.
19. Clarke M, Dodson PM. PKC inhibition and diabetic microvascular complications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 21: 573-586.
20. Davis MD, Sheetz MJ, Aiello LP i wsp. Effect on roboxistaurin on the visual acuity decline associated with long-standing diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 1-4.
21. Comer GM, Ciulla TA. Pharmacotherapy for diabetic retinopathy. *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15: 508-518.
22. Ishida S, Usui Y, Yamashiro K i wsp. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2155-2162.
23. Zhang XL, Wen L, Chen YJ i wsp. Vascular endothelial growth factor up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1 in retinal endothelial cells via reactive oxygen species, but not nitric oxide. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 338-343.
24. Hombrebueno JR, Ali IHA, Xu H i wsp. Sustained intraocular VEGF neutralization results in retinal neurodegeneration in the Ins2 (Akita) diabetic mouse. *Sci Rep* 2015; 5: 18316.
25. Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 752-765.
26. Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y i wsp. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 311-315.
27. Otani A, Takagi H, Suzuma K i wsp. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res* 1998; 82: 619-628.
28. Semba RD, Huang H, Luttj GA i wsp. The role of O-GlcNAc signaling in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Proteomics Clin Appl* 2014; 8: 218-231.
29. Jousen AM, Murata T, Tsujikawa A i wsp. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol* 2001; 158: 147-152.
30. Doganay S, Evereklioglu C, Er H i wsp. Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye (Lond)* 2002; 16: 163-170.
31. Kuppermann BD, Blumenkranz MS, Haller JA i wsp. Randomized controlled study of an intravitreal dexamethasone drug delivery system in patients with persistent macular edema. *Arch Ophthalmol* 2007; 125: 309-317.
32. Kowluru RA. Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta Diabetol* 2001; 38: 179-185.
33. Galvão I, Rago F, Moreira IZ. Angiotensin 1-7 and Inflammation. W: Santos RAS (red.). *Angiotensin-(1-7). A Comprehensive Review*. Springer Nature Switzerland, Cham 2019; 201-218.
34. Callanan D, Williams P. Topical nepafenac in the treatment of diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol*. 2008; 2: 689-692.
35. Barber AJ, Lieth E, Khin SA i wsp. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 1998; 102: 783-791.
36. Carrasco E, Hernández C, Miralles A i wsp. Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration. *Diabetes Care* 2007; 30: 2902-2908.
37. Garcia-Ramirez M, Hernández C, Villarreal M. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2009; 52: 2633-2641.
38. Simó R, Stitt AW, Gardner TW. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia* 2018; 61: 1902-1912.
39. Simó R, Hernandez C. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 25: 23-33.
40. Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SE. The Significance of Vascular and Neural Apoptosis to the Pathology of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 1156-1163.
41. Simó R, Bandello F, Egan C i wsp. Topical administration of somatostatin and brimonidine in the early stages of diabetic retinopathy: results of the EUROCONDOR study. 2017 ARVO Annual Meeting Abstract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58: 5797.

Omówienie:

Zmniejszenie siatkówkowego przepływu krwi jest jednym z pierwszych zjawisk obserwowanych w przebiegu cukrzycy. Przewlekłe niedotlenienie- hipoksja siatkówki wraz z hiperglikemią warunkują powstanie retinopatii cukrzycowej poprzez wpływ na liczne szlaki i układy.

Wzrost aktywności szlaku sorbitolu, zwiększenie nieenzymatycznej glikacji białek, wzrost aktywności szlaku diacyloglicerolu i kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C* – PKC), nadprodukcja czynników wzrostu (czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego- VEGF i insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *insulin-like growth factor* – IGF-1)), zmiany hemodynamiczne, nasilenie stresu oksydacyjnego, aktywacja układu renina–angiotensyna–aldosteron, subkliniczne zapalenie wraz z leukostazą- to mechanizmy odgrywające rolę w patogenezie retinopatii cukrzycowej. Większość z nich łączy się ze sobą – głównie za sprawą aktywności PKC, wzrostu aktywności VEGF czy leukostazy.

Szczegółowa analiza wyżej wymienionych patomechanizmów jest przedmiotem licznych badań, będących nadzieją dla nowych terapii retinopatii cukrzycowej.

2.2 Artykuł: „The Relation between Body Mass Index and Retinal Photoreceptor Morphology and Microvascular Changes Measured with Adaptive Optics (rtx1) High-Resolution Imaging”

Celem artykułu była analiza wpływu wartości wskaźnika masy ciała- BMI na morfologię siatkówki. Do oceny komórek receptorowych- czopków i zmian mikronaczyniowych zastosowano kamerę rtx1TM, posługującą się techniką optyki adaptywnej.

Kryteria włączenia do badania obejmowały: płeć żeńską oraz wiek powyżej 18 lat. Choroby ogólne (stan przedcukrzycowy, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia), niktynizm, stosowanie leków (steroidów, doustnej antykoncepcji oraz środków anabolicznych) dyskwalifikowały i tym samym eliminowały z udziału w badaniu. Kryteria wykluczające obejmowały również choroby okulistyczne- krótkowzroczność >6 dioptrii, astygmatyzm powyżej 2,5 dioptrii, zmniejszona przezierność ośrodków optycznych (uniemożliwiająca wykonanie badania), brak centralnej fiksacji oraz inne choroby plamki żółtej w wywiadzie.

Grupa badana liczyła 28 kobiet- 11 z nich miało stwierdzoną nadwagę (BMI >25 kg/m² < 29.9 kg/m²), a 16 otyłość (BMI >30 kg/m²). Grupę kontrolną tworzyło 19 kobiet z BMI < 25 kg/m².

Przy pomocy rtx1TM wykonano skany w 4 obszarach siatkówki- położonych w odległości 2 stopni (około 540–600 μm) skroniowo, nosowo, górą, dołem od dołka plamki żółtej. Analizy naczyń dokonano, wykonując zdjęcia naczyń o wielkości od 70 do 130 μm, zlokalizowanych w kwadrancie górno-skroniowym siatkówki.

Praca Oryginalna.

Research Article

The Relation between Body Mass Index and Retinal Photoreceptor Morphology and Microvascular Changes Measured with Adaptive Optics (rtx1) High-Resolution Imaging

Anna Zaleska-Żmijewska ¹, Zbigniew Wawrzyniak ²,
Magdalena Kupis ¹ and Jacek P. Szaflik ¹

¹Department of Ophthalmology, SPKSO Ophthalmic Hospital, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland
²Faculty of Electronics and Information Technology, Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland

Correspondence should be addressed to Magdalena Kupis; magdalennakupis@gmail.com

3 HJWFJE %HFNCF3 3 FVJFE ' FCSVBSZ " LDFQFE ' FCSVBSZ 1 VQVJ FE ' FCSVBSZ

Academic Editor: Siamak Ansari-Shahrezaei

Copyright © 2021 Anna Zaleska-Żmijewska et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Overweight and obese patients are at risk for diabetes, cardiovascular disorders, and microvascular complications. The rtx1TM (Imagine Eyes, France) is a microscope that allows near histological visualizations of cones and retinal microcirculation. **Objective.** This study analysed the cones and retinal microvascular changes in a group of 47 healthy women with different BMI values. Participants were divided into 2 groups: the BMI group (28 women with BMI >/25) and the control group (19 lean women with BMI <25). **Results.** The lumen and diameter of retinal arteries were not significantly different between groups. There were significant differences in the thickness of arteriole walls. The WLR and WCSA values differed significantly between the control and BMI groups (for WLR 0.25 ± 0.03 vs. 0.29 ± 0.03 , $p < 0.001$; for WCSA 4136.7 ± 1140.0 vs. 5217.3 ± 944.0 , respectively, $p < 0.001$). In healthy eyes, cone density and morphology were not affected by weight. **Conclusions.** Retinal image analysis with rtx1 offers a novel noninvasive measurement of early changes in retinal vasculature that are not detectable during routine clinical examination. Abnormalities of retinal arterioles found by rtx1TM examination should be considered as a strong risk factor for cardiovascular changes resulting from overweight and obesity.

1. Introduction

The impact of obesity on general health and increased risk of cardiovascular diseases (CVD) is well known [1–6]. The relationship between body mass index (BMI), CVD risk factors, and vascular disease endpoints was prospectively examined in Framingham Heart Study participants, who were followed for up to 44 years [1]. People with obesity more often develop coronary heart disease and large-vessel atherosclerosis in the carotid and femoral arteries [2, 4–6]. The increased carotid intima-media thickness (IMT), which is one of the early markers of subclinical atherosclerosis and may predict future myocardial infarction and stroke, was found in young, healthy women, with no known cardiovascular disease but with obesity [7]. There is some evidence

that, even in healthy individuals, obesity is associated with impaired microvascular function and increased risk of hypertension and insulin resistance [8–12].

The retina is an easily accessible part of the microcirculation and in vivo evaluation of microvascular changes due to different disorders can be done by examining the eye. The development of diagnostic tools for retinal microvasculature has been difficult because of its location in the posterior segment of the eye and very small size (200–300 μm in thickness) [13, 14]. New diagnostic imaging methods have gradually been introduced, including colour fundus photography, fluorescein angiography, scanning laser ophthalmoscopy, and optical coherence tomography (OCT) [14]. Digital retinal photography and new imaging technologies now allow more precise noninvasive

visualization of subtle retinal changes. The high reliability of retinal photography has been proved in the Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC) [15].

Advances in retinal imaging devices and the development of more sophisticated optical systems have made it possible to capture enface images of photoreceptors and microcirculation. Adaptive optics (AO) is a noninvasive method for visualizing microcirculation and retinal structures with resolution comparable to those achieved in histological studies [16–18]. The rtx1TM (Imagine Eyes, Orsay, France) is a microscope that uses AO technology. The AO imaging system corrects aberrations arising from various refractive surfaces within the eye. The rtx1 microscope includes image acquisition and object recognition software for image analysis oriented towards cones and vessels [16].

The available international literature offers several publications that examine findings using the rtx1 in healthy patients [18–22]. To our knowledge, there are no publications based on rtx1 measurements regarding changes in the retinal photoreceptors and retinal arterioles depending on the body mass index (BMI).

This study therefore analysed cone parameters and retinal microvascular changes in a group of healthy women with different BMI values.

2. Methods

Retinal examinations with the rtx1 device were conducted between May and July 2018 at the Department of Ophthalmology, Second Faculty of Medicine, the Medical University of Warsaw, located in the Ophthalmic University Hospital in Warsaw. The study protocol was approved by the Bioethical Commission of the Medical University of Warsaw. Each patient received both oral and written information explaining the objective and design of the study, the operating principles of the device, and the examination procedure. In accordance with the Declaration of Helsinki, written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study.

2.1. Eligibility Criteria. The study group consisted of adult (>18 years, white European) women, volunteers, with normal weight, overweight, or obesity with no known ocular and systemic diseases. Participants were recruited through online advertisements or were relatives or friends of other participants. All patients provided a medical history and current blood samples to verify inclusion and exclusion criteria. The blood tests were collected two days before the retinal examinations with rtx1.

The inclusion criteria for the study group were female gender and, for normal weight, BMI <24.99 kg/m²; for overweight, BMI >25 kg/m² <29.9 kg/m²; for obesity, BMI >30 kg/m². Besides the increased values of BMI participants, participants had no known diseases related to obesity and were not taking any treatment.

The exclusion criteria included the following: diagnosed and treated prediabetic syndrome, diabetes mellitus,

systemic hypertension, hyperlipidaemia, and cigarette smoking, as well as the use of steroids, oral contraception pills, or any anabolic agents.

Hypertension was defined as systolic blood pressure >140 mmHg, diastolic blood pressure >90 mmHg, or self-reported physician diagnosis of hypertension or current use of antihypertensive medications. Diabetes mellitus was defined as fasting plasma glucose (FPG) test >126 mg/dl or if the patient was taking medication for diabetes. There was no possibility of performing a 2-hour oral glucose tolerance test (OGTT) during the screening visit, so only patients with already diagnosed impaired fasting glucose (IFG) were excluded from the study. BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters.

The ophthalmic exclusion criteria were refractive errors for myopia >6 dioptre or astigmatism >2.50 dioptre cylindrical, the presence of media opacities, a scar in the fovea, and no central fixation.

Eligibility for study participation was confirmed by comprehensive ocular examination. Participant sampling, recruitment, and exclusion are described in the flowchart diagram (Figure 1).

2.2. Patients Characteristics. Initially, a group of 86 women volunteers were asked to complete a questionnaire about lifestyle risk factors and medical history. Of this group screened, 26 were excluded due to systemic diseases, which were currently treated (diabetes mellitus or impaired glucose tolerance, 6; hypertension, 16; and both diseases in 4 cases); 60 women were invited to participate in the study, and 51 came to the Outpatient Clinic for blood tests. Based on the results of the blood tests, we had to exclude a further 4 women. The final group of 47 participants was divided into two groups. The study group consisted of 28 women with BMI >25 and without any systemic diseases treated up to the time when the study procedures were performed (BMI group); 11 of these were overweight and 16 were obese. The control group consisted of 19 lean women with BMI <25 (control group; Figure 1).

2.3. Image Acquisition with the rtx1TM adaptive Optics (AO) Camera. An AO retinal camera (rtx1TM; Imagine Eyes, Orsay, France) was used to acquire images of parafoveal cones and retinal arterioles in all participants. The imaging device is composed of 3 main components: high-resolution fundus camera, a Shack–Hartmann wavefront sensor, and a deformable mirror for real-time correction of the aberrations of the ocular wavefront. The rtx1TM uses enface reflectance imaging with flashed, noncoherent near infrared illumination. Two computer programs are provided by the manufacturer to analyse the examination findings: AODetect (for photoreceptor analysis) and AODetectArtery (for retinal vasculature analysis).

All subjects also had noncontact ocular biometry using the IOL Master (Carl Zeiss Meditec AG, Henningsdorf, Germany).

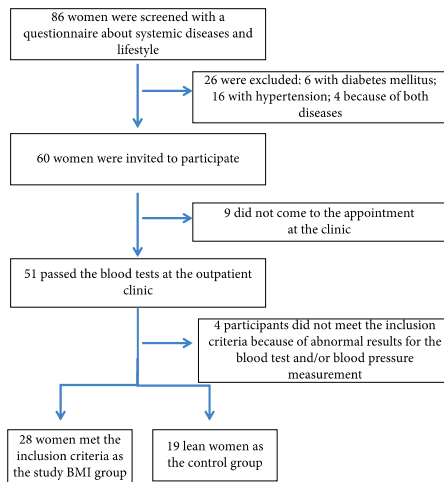


FIGURE 1: Flowchart diagram of participant sampling, recruitment, and exclusion criteria.

2.4. Protocol for rtx1 Examination and Evaluation Parameters. Each rtx1 examination captured scans of the 4 perifoveal areas of the retina, 2° (approximately $540\text{--}600\ \mu\text{m}$) off the centre of the fovea (temporally, nasally, superiorly, and inferiorly) with a standardized $80 \times 80\ \mu\text{m}$ sampling window size (fixed by the manufacturer in the new model). Most of the examinations did not require dilation of the pupils. In cases in which the width of the pupil was less than 4 mm, one drop of 1% tropicamide (Polfa Warszawa) was administered. None of the participants from the control group required pupil dilation and only 4 (14.3%) participants from the BMI group had the image acquisition after 1% tropicamide drop. Study participants were instructed to fixate on the yellow fixation cross in the camera. After finding the foveal reference point of the patient, eccentricities of 2° along the meridians were measured and used for further images analyses. In most cases, the acquisition of the best image of cones required at least 3 scans. In retinal arteries imaging, one scan was enough. It took approximately only 2–5 seconds to reach a single scan. The best sections of images captured were selected and analysed using the image processing and recognition software AODetect and AODetectArtery.

The analyses of the photoreceptors included the mean (\pm standard deviation) cone density per square millimetre of the retinal surface and the morphology of the cones in terms of the neighbourhood (Voronoi domain), regularity, and cones spacing. The arithmetic average of 3 measurements of the selected cones images was taken for statistical analysis.

In the analyses of retinal vessels, three measurements of the retinal arteriole with a size between 70 and $130\ \mu\text{m}$ in the temporal superior quadrant were taken. The arithmetic average of these 3 values was taken. Measurements of the total vessel diameter (VD), the two walls thickness (wall 1,

wall 2), and the lumen diameter (LD) were recorded, and the wall-to-lumen ratio (WLR) and the cross-sectional area of the vascular wall (WCSA) were then automatically calculated with the dedicated software. Vessel diameter resulted from the single arteriolar wall (WT) plus vessel lumen (LD) and single arteriolar wall thickness (WT): $VD = WT + (WT + LD)$. WLR was calculated as $WLR = 2 \cdot WT / LD$. WCSA of the vascular wall was measured on the basis of vessel diameter and lumen diameter, and the value was obtained automatically from the AO artery detect software. We use automated cone and vessel parameters identification, in some cases with manual review of the artery profile.

2.5. Medical History of the BMI Group and the Control Group. The results of blood samples were analysed, including FPG, glycated haemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}), triglyceride (TG), total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), platelets, BMI, and the correlation between chosen parameters and cone density and retinal artery parameters.

2.6. Statistical Analyses. Descriptive analyses were conducted for all variables that were visually assessed for outliers. Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests were used to determine if the parameters were normally distributed. Because the parameters were not normally distributed, we used the Wilcoxon signed rank test to compare data from the right and the left side and the Mann–Whitney U test to compare the BMI and control groups.

Simple and multiple linear regressions were performed to determine the effect of blood and serum lipid parameters and BMI on parameters measured using the rtx1. Potential modifiers were examined in stratified analysis. All probabilities quoted are 2-sided, and a significant p value was defined as <0.05 . Statistically significant results obtained using t test and Mann–Whitney U test are presented after Bonferroni correction for multiple comparisons [23].

The Pearson correlation coefficient (r) was calculated to examine the linear relationship between two continuous variables. Statistical analyses were generated with TIBCO™ Statistica™ 13.1 (data analysis software system), version 13 (<http://www.tibco.com>).

3. Results

The best-corrected visual acuity (BCVA) was 1.0 in both groups.

Age and axial length were not significantly different between groups. The mean (\pm standard deviation) age in the control group and the BMI group was $45.05 (\pm 9.7)$ and $50.79 (\pm 6.42)$, respectively ($p = 0.0654$).

The mean axial length of the right eye (RE) in the control group was 23.12 ± 0.97 mm and that of the left eye (LE) was 23.12 ± 1.17 mm (Mann–Whitney U test, $p = 0.580$). The mean axial length of the RE in the BMI group was 23.21 ± 0.99 mm and that of the left eye was 22.68 ± 1.02 mm

(*p* *t* test, *p* = 0.417). Because eyes did not differ in terms of axial lengths, only results obtained from right eyes were included in further analyses.

The characteristics of both groups are shown in Table 1.

The results of the blood test after Bonferroni correction (adjusted *p* value = 0.0071) presented in Table 2 are not significant. The results of serum lipid parameters revealed significant differences between groups in levels of HDL and TG after Bonferroni correction (adjusted *p* value = 0.0125). Compared with lean women, women with higher BMI levels had dyslipidaemia with significantly lower HDL values and higher TG. The mean FPG and LDL were slightly higher in the group with greater BMI, but the difference was not significant. The results of the blood and serum lipid parameters for both groups are presented in Tables 2 and 3.

Although all individuals were normotensive, systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure were significantly higher in women with higher BMI compared to the control group (SBP 138.1 ± 7.0 vs. 128.7 ± 2.3, *p* = 0.02; DBP 83.4 ± 5.7 vs. 76.3 ± 1.5, *p* = 0.03, respectively).

3.1. Cone Parameters. Cone density was significantly lower after Bonferroni correction and interphotoreceptor spacing higher in the BMI group compared to the control group at the 2° retinal eccentricities only in the temporal quadrant. In other locations, the cone density was comparable between groups, with a higher standard deviation in the control group. The results of cone density for all quadrants are presented in Table 4.

Cone packing regularity was assessed through analysis of the Voronoi domains. There were no significant differences in cone regularity after Bonferroni correction (adjusted *p* value = 0.0042) and the mean percentage of cones with hexagonal Voronoi tiles (N%6) in all analysed locations of the retina between both groups (Table 5).

3.2. Retinal Artery Parameters. The mean lumen and total diameter of the analysed retinal arteries were not significantly different between groups. The mean of both artery walls (wall1, wall2) were significantly thicker in the BMI group than in the control group (*p* < 0.001) after Bonferroni correction (adjusted *p* value = 0.0084). The mean WLR and WCSA values also differed significantly between the control and the BMI groups (for WLR 0.25 ± 0.03 vs 0.29 ± 0.03, *p* < 0.001; for WCSA 4136.7 ± 1140.0 vs. 5217.3 ± 944.0, respectively, *p* < 0.001) after Bonferroni correction (adjusted *p* value = 0.0084), as shown in Table 6.

Figures 2 and 3 present the analysis of the cones mosaic morphology and the retinal artery taken from an eye of a patient from the control group and from the BMI group, respectively. The image of the microvascular changes in an artery taken from an overweight woman is shown in Figure 3, with increased WLR, WCSA, and thickening of arteriole walls (Figures 2 and 3).

TABLE 1: Overall and group characteristics (*n* = 47).

No. of subjects	Total	BMI group	Control group	<i>p</i> value
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
	47 (100)	28 (59.6)	19 (40.4)	
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
Age (years)	48.9 ± 8.1	45.1 ± 9.7	50.8 ± 6.4	0.065
AL (mm)	23.20 ± 1.03	23.21 ± 0.99	23.12 ± 0.97	0.974 [†]
BMI	28.1 ± 4.9	31.1 ± 3.8	23.8 ± 1.2	<0.001

[†]*t* test; SD: standard deviation; AL: mean axial length; BMI: body mass index.

TABLE 2: The results of the blood parameters in both groups (*n* = 47) after Bonferroni correction (adjusted *p* value = 0.0071).

Blood parameters	Mean ± SD	Mean ± SD	<i>p</i> value
	Control group	BMI group	
WBC (k)	6.56 ± 1.81	6.60 ± 1.69	0.839
RBC (M)	4.66 ± 0.35	4.55 ± 0.26	0.444
HGB (g/dl)	13.21 ± 1.37	13.46 ± 0.90	0.457
HCT (%)	40.56 ± 3.18	40.62 ± 2.30	0.991
PLT (k)	266.2 ± 77.4	252.0 ± 58.3	0.482
FPG (mg/dl)	92.6 ± 7.2	96.9 ± 7.3	0.028
HbA _{1c} (%)	5.36 ± 0.31	5.5 ± 0.31	0.333

SD: standard deviation; FPG: fasting plasma glucose; HbA_{1c}: glycated haemoglobin A_{1c}; TG: triglyceride; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; HDL: high-density lipoprotein cholesterol; WBC: white blood cells; RBC: red blood cells; HGB: haemoglobin; HCT: haematocrit; PLT: platelets.

3.3. Correlation between Cones and Artery and Parameters. Adjustment WLR for diastolic blood pressure, lumen, and HbA_{1c} revealed the association between increased BMI and increased wall-to-lumen ratio in linear regression analysis.

No correlations were found between cone parameters and any of the blood parameters (*p* > 0.05). The differences in retinal artery parameters found between lean and overweight women did not change with increasing BMI values.

4. Discussion

In this study we provided noninvasive measurements of cones and retinal arteries morphologies with rtx1 AO in a group of healthy women. We excluded from the study women with already diagnosed hypertension, prediabetes, diabetes mellitus, or other cardiovascular disorders, which resulted in a smaller study group. We categorized the participants into two groups depending on BMI values. The control group consisted of lean women and the study (BMI) group consisted of women with BMI >25 kg/m².

Overweight and obesity are known risk factors for the development of metabolic syndrome, diabetes, cardiovascular disorders, and ischaemic stroke [1–8, 24, 25]. The pathophysiological mechanism behind the relationship between obesity and microvascular dysfunction is probably

TABLE 3: The results of the serum lipid parameters in both groups ($n = 47$) after Bonferroni correction (adjusted p value = 0.0125).

Serum lipid parameters	Mean \pm SD:	Mean \pm SD:	p value
	Control group	BMI group	
Total cholesterol (mg/dl)	198.8 \pm 28.8	189.8 \pm 21.4	0.229
HDL (mg/dl)	64.1 \pm 12.5	53.9 \pm 12.9	0.012*
LDL (mg/dl)	112.5 \pm 23.9	125.8 \pm 30.1	0.120
TG (mg/dl)	108.9 \pm 61.0	136.6 \pm 33.0	0.006*

SD: standard deviation; TG: triglyceride; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; HDL: high-density lipoprotein cholesterol; WBC: white blood cells; RBC: red blood cells; HGB: haemoglobin; HCT: haematocrit; PLT: platelets. *Statistically significant results after Bonferroni correction ($p < 0.0125$).

TABLE 4: Mean cone density in 4 retinal quadrants at 2° eccentricities in both groups ($n = 47$) after Bonferroni correction (adjusted p value = 0.0125).

Quadrants	Mean (\pm SD) cone density, cone/mm ²	Mean (\pm SD) cone density, cone/mm ²	p value [†]
	Control group	BMI group	
<i>T</i>	26478 \pm 2211	24144 \pm 2654	0.006*
<i>N</i>	23880 \pm 6924	24597 \pm 2265	0.622
<i>S</i>	23694 \pm 7077	23734 \pm 2874	0.979
<i>I</i>	23262 \pm 7064	23879 \pm 2415	0.679

[†] p t test; SD, standard deviation; T: temporal; N: nasal; S: superior; I: inferior. *Statistically significant results after Bonferroni correction ($p < 0.0125$).

TABLE 5: Mean (\pm SD) spacing, Voronoi, and cone regularity in Control and BMI groups in 4 quadrants after Bonferroni correction (adjusted p value = 0.0042).

Cone parameters in 4 quadrants	Control group	BMI group	p value
Spacing_ <i>T</i> (μ m)	6.80 \pm 0.30	7.13 \pm 0.38	0.006
Voronoi <i>N</i> %6_ <i>T</i> (%)	47.7 \pm 5.9	45.2 \pm 5.1	0.154
Regularity_ <i>T</i> (%)	93.9 \pm 3.2	93.1 \pm 2.7	0.368
Spacing_ <i>N</i> (μ m)	6.45 \pm 1.81	7.06 \pm 0.32	0.096
Voronoi <i>N</i> %6_ <i>N</i> (%)	44.2 \pm 12.8	47.3 \pm 5.4	0.280
Regularity_ <i>N</i> (%)	88.2 \pm 24.5	93.9 \pm 2.4	0.228
Spacing_ <i>S</i> (μ m)	6.48 \pm 1.83	7.19 \pm 0.44	0.058
Voronoi <i>N</i> %6_ <i>S</i> (%)	44.4 \pm 13.3	48.4 \pm 5.7	0.1135
Regularity_ <i>S</i> (%)	71.5 \pm 18.9	75.6 \pm 21.2	0.4949
Spacing_ <i>I</i> (μ m)	7.46 \pm 2.06	6.57 \pm 1.86	0.1586
Voronoi <i>N</i> %6_ <i>I</i> (%)	41.7 \pm 11.8	44.4 \pm 13.3	0.4866
Regularity_ <i>I</i> (%)	86.5 \pm 22.3	88 \pm 24.5	0.8371

SD: standard deviation; T: temporal; N: nasal; S: superior; I: inferior; regularity, the summary of the percentage of pentagonal, hexagonal, and heptagonal cones in the analysed image; Voronoi *N*%6: percentage of hexagonal cones in analysed image; spacing, interphotoreceptor distance.

TABLE 6: Characteristic of retinal artery parameters in the BMI and control groups ($n = 28$ and $n = 19$) after Bonferroni correction (adjusted p value = 0.0084).

Parameters	Mean (\pm SD)	Mean (\pm SD)	p value
	Control group	BMI group	
Lumen (μ m)	96.47 \pm 12.20	99.97 \pm 11.30	0.352†
Total diameter (μ m)	120.5 \pm 14.4	128.8 \pm 13.3	0.064†
WALL_1 (μ m)	12.14 \pm 1.9	14.21 \pm 2.7	<0.001†*
WALL_2 (μ m)	11.06 \pm 3.6	14.60 \pm 2.62	<0.001*
WLR (l)	0.25 \pm 0.03	0.29 \pm 0.03	<0.001†*
WCSA (μ m ²)	4136.7 \pm 961.0	5217.3 \pm 1041.0	<0.001*

[†]t test; SD: standard deviation; WLR: wall-to-lumen ratio; WCSA: wall cross-sectional area. *Statistically significant results after Bonferroni correction ($p < 0.0084$).

multifactorial and has been analysed in several studies [6, 8, 9, 11, 12].

Our results showed that the mean lumen and total diameter of the analysed retinal arteries were not significantly different

between the control and BMI groups. We found significant differences in the thickness of retinal arteriole walls in women with greater BMI. The WLR and WCSA parameters were also significantly higher in participants with overweight and obesity.

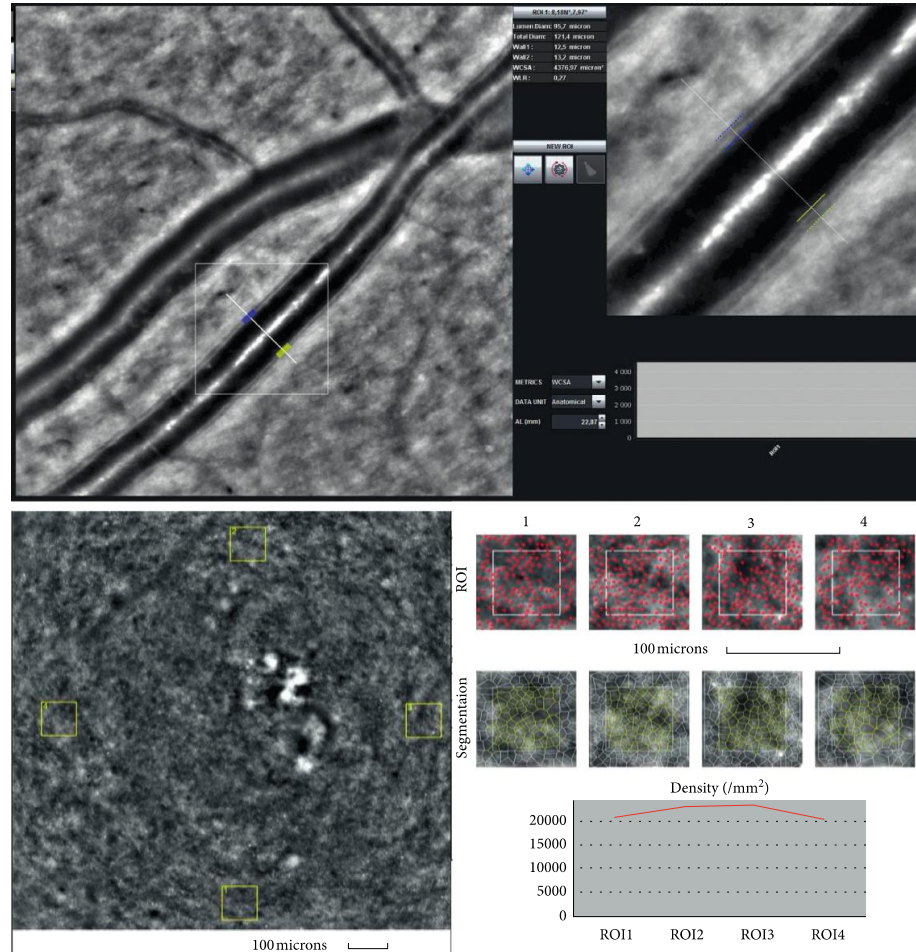


FIGURE 2: Image of the retinal artery (upper) and of four retinal cones squares windows (cones depicted in red and Voronoi triangulation) (lower) for a patient from the control group (IK) captured by rtx1 AO retinal camera. The following parameters are shown: in the artery analysis; Lumen: $96.7 \mu\text{m}$, Total diameter: $121.4 \mu\text{m}$, Wall_1: $12.5 \mu\text{m}$, Wall_2: $13.2 \mu\text{m}$, WLR- 0.27, WCSA- $4277.0 \mu\text{m}^2$, AL- 22.87 mm ; in the cone analysis: for different ROI (region of interest) squares: Regularity: 82.9–92.5%, Cone spacing: $7.21\text{--}7.71 \mu\text{m}$, Cone density: $20264\text{--}22831 \text{ cone}/\text{mm}^2$.

Our results suggest that individuals with overweight and obesity demonstrate signs of an early dysfunction of the retinal arterioles as measured by the wall thickness and WLR parameters. These findings are in compliance with results described by de Jong and coworkers with a similar study group [8]. There were no differences in baseline perfused nail fold capillary density between lean and obese women, but post-occlusive capillary recruitment and microvascular endothelium-dependent vasodilation were decreased in obese women

[8]. Other studies have also demonstrated increased carotid intima-media thickness in young, healthy women, without known cardiovascular disease, but with obesity [7, 24, 25].

The obesity-related impairment in microvascular function may contribute to the increased risk of developing microangiopathy, hypertension, and insulin resistance [8, 9, 11, 26, 27].

Retinal circulation is closely related to cerebral circulation and may be a marker of cerebral arteriole health. There

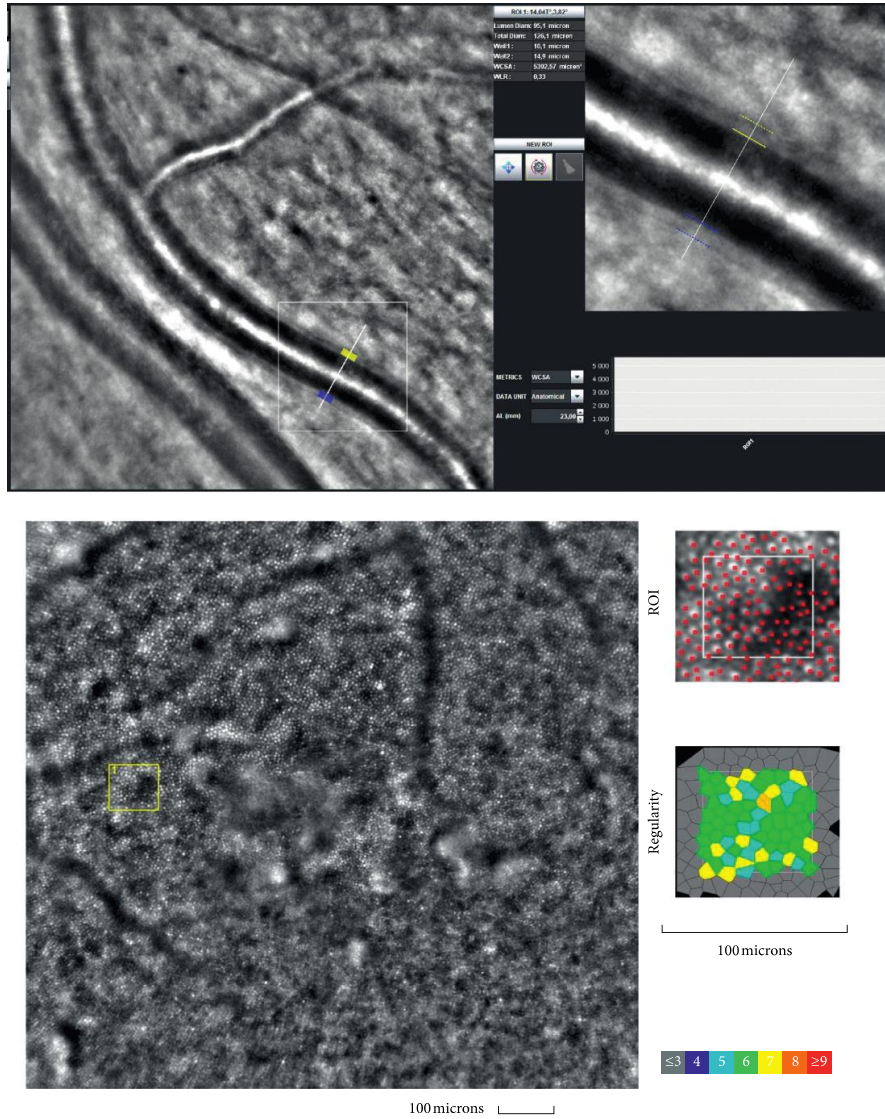


FIGURE 3: Image of the retinal artery (upper) and the cones mosaic window (cones depicted in red and Voronoi triangulation) (lower) for a BMI group patient (AR) captured by rtx1 AO retinal camera. The following parameters are shown: in the artery analysis; Lumen: 95.1 μm , Total diameter: 126.1 μm , Wall_1: 16.1 μm , Wall_2: 14.9 μm , WLR: 0.33, WCSA: 5302.6 μm^2 , AL: 23.00 mm; in the cone analysis: for different ROI (region of interest) squares: Regularity: 98.6%, Cone spacing: 7.89 μm , Cone density: 19636 cone/ mm^2 .

is some evidence that obesity, even in healthy individuals, is associated with an increased risk of ischaemic stroke [24, 25]. In a large prospective cohort study of 39,000

apparently healthy women, BMI was strongly associated with total and ischaemic stroke but not with haemorrhagic stroke [25]. A statistically significant trend across BMI

categories for total and ischaemic stroke was found with increased risks for ischaemic stroke beginning with BMI values 27.0 kg/m^2 , which steadily increased with higher BMI. Women with BMI 35 kg/m^2 had a 2-fold increase in the risk of total stroke and an almost 3-fold increase in the risk of ischaemic stroke compared with women with BMI 20 kg/m^2 [25]. Data from the Nurses' Health Study showed similar associations and found a 2-fold increase in the risk of ischaemic stroke among women with BMI 32 kg/m^2 compared with women with BMI 21 kg/m^2 [24].

In clinical practice, the examination of the retinal vessels is commonly used to assess retinal microvascular damage in diabetes and as an indicator of target organ damage in hypertension.

Although all individuals participating in our study were normotensive, systolic and diastolic blood pressure were significantly higher in women with higher BMI compared to the control group. The fact that there were some differences in blood pressure could explain the differences in microvascular function between lean and obese women. This may suggest that the presence of obesity is an important predictor of microvascular dysfunction before the onset of hypertension. These suggestions are consistent with the results of other authors who described the association between obesity and microvascular dysfunction [9–11].

Changes in small artery structure characterized by increased WLR are a characteristic feature of arterial remodelling in hypertension [28–30]. This finding can be the result of growth and/or remodelling of the vascular wall [28, 29]. In our study, we found increases of both parameters WLR and WCSA that may suggest growth of the arteries' wall.

We have described similar findings in retinal arteries in another study in patients with diagnosed prediabetes, without hypertension or other vascular disorders, where the increased WLR parameter was correlated with increased BMI and total cholesterol [31].

In contrast to our results are the results from the large prospective study of adults from Wisconsin, where retinal arteriolar narrowing was not found to be positively associated with obesity development during a 15-year follow-up [12]. Retinal venular widening has been identified among previously nonobese subjects who gained weight during the period of observation as significantly different than in participants with normal weight [12].

Aside from the assessment of retinal vessels, we used the rtx1 camera to analyse and compare cone density and regularity at different BMI levels. Our findings indicate that cone density and morphology are not affected by weight in healthy eyes.

4.1. Study Limitations. We have identified several possible limitations of this study, such as study size and inclusion criteria. Due to our inclusion criteria, we did not check the retinas of participants with diagnosed cardiovascular disorders. We also cannot be sure that none of the participants had insulin resistance because this was not analysed. The only participants of this study were women because we

wanted to exclude sex differences in adipose tissue distribution and its possible influence on the vasculature. The study was designed as an exploratory study without an a priori sample size calculation. The present results may underestimate the effects of obesity in general because we studied a group of healthy, nonhypertensive, and nondiabetic overweight and obese women. Future prospective studies with an expanded sample, including both genders, should track changes in the microvascular and metabolic risk factors and explore their possible interactions.

5. Conclusions

Retinal image analysis with rtx1 offers a novel noninvasive measurement of early changes in the neural cells and retina vasculature that are not detectable on routine clinical examination. AO retinal imaging accurately identified retinal microvasculature and may serve as a promising, noninvasive screening tool for the early detection of microvascular complications. Our observations are consistent with the findings in other vascular beds (skin, cardiac, and cerebral microcirculation) showing a generalized adverse effect of overweight and obesity on microvascular function. Retinal arterioles may present early pathological changes, even without the diagnosis of metabolic syndrome or cardiovascular disorders in overweight and obese women.

Data Availability

The data sets used and analysed during this study are available from the corresponding author in consideration of potentially applying restrictions on reasonable request.

Ethical Approval

The study is based entirely on anonymized data in accordance with the Declaration of Helsinki.

Disclosure

None of the financial sponsors did contribute to data collection, interpretation of the data, or the decision to approve and submit the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Acknowledgments

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- [1] P. W. F. Wilson, R. B. D'Agostino, L. Sullivan, and W. B. Kannel, "Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk," *Archives of Internal Medicine*, vol. 162, no. 16, pp. 1867–1872, 2002.

- [2] R. P. Bogers, W. J. Bemelmans, W. J. Hoogenveen et al., "Association of overweight with increased risk of coronary heart disease partly independent of blood pressure and cholesterol levels: a meta-analysis of 21 cohort studies including more than 300 000 persons," *Archives of Internal Medicine*, vol. 167, no. 16, pp. 1720–1728, 2007.
- [3] A. E. Field, E. H. Coakley, A. Must et al., "Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period," *Archives of Internal Medicine*, vol. 161, no. 13, pp. 1581–1586, 2001.
- [4] X. Song, P. Jousilahti, C. D. Stehouwer et al., "Cardiovascular and all-cause mortality in relation to various anthropometric measures of obesity in Europeans," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 25, no. 3, pp. 195–304, 2015.
- [5] X. He, C. Liu, Y. Chen, and Y. Dong, "Overweight without central obesity, cardiovascular risk, and all-cause mortality," *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 93, no. 6, pp. 709–720, 2018.
- [6] J. E. Manson, G. A. Colditz, M. J. Stampfer et al., "A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women," *New England Journal of Medicine*, vol. 322, no. 13, pp. 882–889, 1990.
- [7] J. Lo, S. E. Dolan, J. R. Kanter et al., "Effects of obesity, body composition, and adiponectin on carotid intima-media thickness in healthy women," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 91, no. 5, pp. 1677–1682, 2006.
- [8] R. T. De Jongh, E. H. Serné, R. G. IJzerman, and C. D. A. Stehouwer, "Impaired microvascular function in obesity," *Circulation*, vol. 109, no. 21, pp. 2529–2535, 2004.
- [9] E. H. Serné, C. D. Stehouwer, J. C. Ter Maaten et al., "Microvascular function relates to insulin sensitivity and blood pressure in normal subjects," *Circulation*, vol. 99, no. 7, pp. 896–902, 1999.
- [10] A. D. Hughes, T. Y. Wong, N. Witt et al., "Determinants of retinal microvascular architecture in normal subjects," *Microcirculation*, vol. 16, no. 2, pp. 159–166, 2009.
- [11] O. Sorop, T. D. Olver, J. van de Wouw et al., "The microcirculation: a key player in obesity-associated cardiovascular disease," *Cardiovascular Research*, vol. 113, no. 9, pp. 1035–1045, 2017.
- [12] A. Shankar, C. Sabanayagam, and B. Klein, "Retinal microvascular changes and the risk of developing obesity: population-based cohort study," *Microcirculation*, vol. 18, no. 8, pp. 655–662, 2011.
- [13] B. Alamouti and J. Funk, "Retinal thickness decreases with age: an OCT study," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 87, no. 7, pp. 899–901, 2003.
- [14] A. Bajwa, R. Aman, and A. K. Reddy, "A comprehensive review of diagnostic imaging technologies to evaluate the retina and the optic disk," *International Ophthalmology*, vol. 35, no. 5, pp. 733–755, 2015.
- [15] D. J. Couper, R. Klein, L. D. Hubbard et al., "Reliability of retinal photography in the assessment of retinal microvascular characteristics: the Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC)," *American Journal of Ophthalmology*, vol. 133, pp. 78–88, 2002.
- [16] M. Lombardo, S. Serrao, N. Devaney, and G. Lombardo, "Adaptive optics technology for high-resolution retinal imaging," *Sensors*, vol. 13, no. 1, pp. 334–366, 2012.
- [17] M. N. Muthiah, C. Gias, F. K. Chen et al., "Cone photoreceptor definition on adaptive optics retinal imaging," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 98, pp. 1073–1079, 2014.
- [18] E. Meixner and G. Michelson, "Measurement of retinal wall-to-lumen ratio by adaptive optics retinal camera: a clinical research," *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 253, no. 11, pp. 1985–1995, 2015.
- [19] K. Y. Li and A. Roorda, "Automated identification of cone photoreceptors in adaptive optics retinal images," *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 24, no. 5, pp. 1358–1363, 2007.
- [20] M. Lombardo, G. Lombardo, D. S. Lomoriello, M. Stirpe, and S. Serrao, "Interocular symmetry of parafoveal photoreceptor cone density distribution," *Retina*, vol. 33, no. 8, pp. 1640–1649, 2013.
- [21] H. Song, T. Y. P. Chui, Z. Zhong, and S. A. Burns, "Variation of cone photoreceptor packing density with retinal eccentricity and age," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 52, no. 10, pp. 7376–7384, 2011.
- [22] M. Lombardo, S. Serrao, and P. Ducoli, "Eccentricity dependent changes of density, spacing and packing arrangement of parafoveal cones," *Ophthalmic and Physiological Optics*, vol. 33, no. 4, pp. 516–526, 2013.
- [23] R. A. Armstrong, "When to use the Bonferroni correction," *Ophthalmic and Physiological Optics*, vol. 34, no. 5, pp. 502–508, 2014.
- [24] K. M. Rexrode, C. H. Hennekens, W. C. Willett et al., "A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women," *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, vol. 277, no. 19, pp. 1539–1545, 1997.
- [25] T. Kurth, J. M. Gaziano, K. M. Rexrode et al., "Prospective study of body mass index and risk of stroke in apparently healthy women," *Circulation*, vol. 111, no. 15, pp. 1992–1998, 2005.
- [26] P. A. Kern, G. B. Di Gregorio, T. Lu, and G. Ranganathan, "Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-expression," *Diabetes*, vol. 52, no. 7, pp. 1779–1785, 2003.
- [27] J. R. Singleton, A. G. Smith, and J. W. Russell, "Microvascular complications of impaired glucose tolerance," *Diabetes*, vol. 52, no. 12, pp. 2867–2873, 2003.
- [28] A. S. Izzard, D. Rizzoni, E. Agabiti-Rosei et al., "Small artery structure and hypertension: adaptive changes and target organ damage," *Journal of Hypertension*, vol. 23, no. 2, pp. 247–250, 2005.
- [29] J. B. Park and E. L. Schiffrin, "Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension," *Journal of Hypertension*, vol. 19, no. 5, pp. 921–930, 2001.
- [30] D. Rizzoni, E. Porteri, G. E. Boari et al., "Prognostic significance of small-artery structure in hypertension," *Circulation*, vol. 108, no. 18, pp. 2230–2235, 2003.
- [31] A. Zaleska-Zmijewska, P. Piątkiewicz, B. Śmigielska et al., "Retinal photoreceptors and microvascular changes in pre-diabetes measured with adaptive optics (rtx1TM): a case-control study," *Journal of Diabetes Research*, vol. 2017, Article ID 4174292, 9 pages, 2017.

Omówienie:

Liczne publikacje wykazały wpływ otyłości i nadwagi na rozwój chorób metabolicznych i sercowo-naczyniowych [39,40]. Zwiększona grubość warstwy środkowej i wewnętrznej tętnic (wskaźnik IMT (ang. *ntima-media thickness*)) u osób z nieprawidłowym BMI koreluje z podwyższonym ryzykiem powikłań kardiologicznych [40].

Według badania przeprowadzonego w toku doktoratu średni wymiar światła, jak i całego naczynia nie jest istotnie zależny od wartości BMI. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [41] wykazano, iż u osób z nadwagą lub otyłością obserwuje się wczesne objawy patologii naczyniowej, takie jak, zwiększona grubość ściany naczynia lub zwiększony współczynnik WLR (ang. *Wall-to-lumen ratio*).

Udowodniono, iż w grupie badanej (pomimo wcześniejszego wykluczenia nadciśnienie tętnicze w wywiadzie) średnie wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego były znamienne wyższe w porównaniu do pacjentów z prawidłowym BMI. Zasugerowano tym samym, iż zmiany mikronaczyniowe, obserwowane w otyłości, są czynnikiem predysponującym do rozwoju nadciśnienia tętniczego.

Już wcześniej udowodniono, iż wysokie ciśnienie tętnicze prowadzi do pogrubienia ściany naczyń i nieprawidłowej wartości współczynnika WLR [42,43]. Badanie przeprowadzone w toku przewodu doktorskiego wykazało, że podwyższony poziom BMI i nadciśnienie tętnicze doprowadzają do podobnego remodellingu naczyń siatkówkowych.

Patologia mikronaczyniowa siatkówki, zobrazowana w grupie pacjentów z otyłością, odpowiada odchyleniom obserwowanym w stanie przedcukrzycowym [21].

Liczne badania wykazały, iż zmiany mikrostruktury naczyń siatkówki, wynikające z nieprawidłowej masy ciała, mogą prowadzić do daleko idących konsekwencji zdrowotnych [44,45,46,47]. Nadciśnienie tętnicze, inuslinooporność, mikroangiopatia cukrzycowa, mikrowaskularne zmiany w krążeniu mózgowia to prawdopodobnie nie jedyne z nich. Wczesna analiza mikrostruktury siatkówki w otyłości może przyczynić się do zmniejszenia ryzyka rozwoju groźnych powikłań naczyniowych.

2.3 Artykuł: „Retinal Photoreceptors and Microvascular Changes in the Assessment of Diabetic Retinopathy Progression: A Two-Year Follow-Up Study”

Celem artykułu była ocena zmian w gęstości i morfologii czopków, stanu naczyń siatkówki w czasie trwania cukrzycy. Do badania wykorzystano nowoczesny aparat rtx1TM, wykorzystujący technologię optyki adaptatywnej. Analizowano korelację zmian mikrostruktury siatkówki ze zmianami ostrości wzroku i centralnej grubości siatkówki.

Do randomizowanego badania włączono 50 pacjentów z rozpoznaną cukrzycą (typ 1 lub 2) oraz 18 zdrowych osób, tworzących grupę kontrolną. Końcowa grupa badana liczyła 41 osób. Warunkiem włączenia do badania był wiek 25-75 lat. Kryteria wykluczające obejmowały: najlepszą skorygowaną ostrość wzroku (ang. *Best corrected visual acuity*- BCVA) poniżej 0.5, zmniejszoną przezierność ośrodków optycznych, uniemożliwiającą wykonanie badania, brak centralnej fiksacji, stan po urazie oka, przebyte iniekcje anti-VEGF, inne choroby plamki żółtej w wywiadzie, krótkowzroczność >6 dioptrii oraz astygmatyzm powyżej 2,5 dioptrii.


Badanie składało się z 3 wizyt- wstępnej, po roku oraz po 2 latach. Każda wizyta obejmowała: ocenę ostrości wzroku, badanie przedniego odcinka oka i dna oka z użyciem lampy szczelinowej, pomiar centralnej grubości siatkówki przy pomocy aparatu OCT Triton oraz pomiarów aparatem rtx1TM- okołodołkowych miejsc siatkówki i skanów tętniczek siatkówki.

Analizowano wpływ poziomu glukozy we krwi, hemoglobiny glikowanej (HbA1c) i BMI na zmiany zachodzące w mikrostrukturach siatkówki w czasie trwania cukrzycy.

Praca Oryginalna.

Article

Retinal Photoreceptors and Microvascular Changes in the Assessment of Diabetic Retinopathy Progression: A Two-Year Follow-Up Study

Magdalena Kupis ^{1,*} , Zbigniew M. Wawrzyniak ², Jacek P. Szaflik ¹ and Anna Zaleska-Żmijewska ¹

¹ Department of Ophthalmology, SPKSO Ophthalmic Hospital, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland

² Faculty of Electronics and Information Technology, Warsaw University of Technology, 00-665 Warsaw, Poland

* Correspondence: magdalennakupis@gmail.com

Abstract: Background: With the increasing global incidence of diabetes mellitus (DM), diabetic retinopathy (DR) has become one of the leading causes of blindness in developed countries. DR leads to changes in retinal neurons and microcirculation. Rtx1TM (Imagine Eyes, Orsay, France) is a retinal camera that allows histological visualisations of cones and retinal microcirculation throughout the DM duration. Objective: This study aimed to analyse the cones and retinal microvascular changes in 50 diabetic individuals and 18 healthy volunteers. The patients participated in the initial visit and two follow-up appointments, one and two years after the study, beginning with Rtx1TM image acquisition, visual acuity assessment, macular OCT scans and blood measurements. Results: The study revealed significant differences in the cone density, mosaic arrangement and vascular morphology between healthy and diabetic patients. The final measurements showed decreased photoreceptor and microvascular parameters in the DR group compared with the control group. Furthermore, in the 2-year follow-up, both groups' Rtx1TM-acquired morphological changes were statistically significant. Conclusions: Rtx1TM technology was successfully used as a non-invasive method of photoreceptors and retinal vasculature assessment over time in patients with diabetic retinopathy. The study revealed a trend toward more vascular morphological changes occurring over time in diabetic patients.

Keywords: diabetic retinopathy; adaptive optics; rtx-1 technology; cone morphology; retinal microcirculation



Citation: Kupis, M.; Wawrzyniak, Z.M.; Szaflik, J.P.; Zaleska-Żmijewska, A. Retinal Photoreceptors and Microvascular Changes in the Assessment of Diabetic Retinopathy Progression: A Two-Year Follow-Up Study. *Diagnostics* **2023**, *13*, 2513. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13152513>

Academic Editor: Jae-Ho Han

Received: 10 July 2023

Revised: 25 July 2023

Accepted: 26 July 2023

Published: 27 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease affecting multiple tissues with subsequent organ failure. The medical world is struggling with an epidemic of diabetes. According to an epidemiologic study from 2019, there were approximately 463 million DM patients globally, which is expected to increase to 700 million patients in the next 25 years [1]. Diabetic retinopathy (DR) is one of the most common complications of DM and has become one of the leading causes of blindness in developed countries. The development and progression of DR is related to the type and duration of diabetes, glucose levels and blood pressure [2].

DR can be classified into five stages: the first stage of no apparent retinopathy, the second stage of mild non-proliferative diabetic retinopathy (M-NPDR), the third stage of moderate NPDR, the fourth stage of severe NPDR (s-NPDR) and the fifth stage of proliferative diabetic retinopathy (PDR) [3].

Persistent hyperglycaemia and hypoxia results in microvascular changes such as loss of pericytes, basement membrane thickening, arteriole wall thickening and formation of microaneurysms, which can characterise the DR onset. However, multiple studies demonstrated that abnormal neuroretinal function precedes the development of these

hallmark vascular lesions [4]. Early perturbations in the diabetic retina involve thinning of the inner retinal layers. Both hyperglycaemia and hypoxia lead to apoptosis of several populations of retinal cells, including retinal ganglion cells, photoreceptors and bipolar cells [5]. Neuroretinal changes may manifest as colour vision defects, decreased contrast sensitivity and electrophysiological abnormalities [6].

As DR is a disease of changes in the retinal neurons and microcirculation, perfect diagnostic procedures should allow early and precise detection. The gold standard for visualising human retinal vessels includes fluorescein angiography (FA). However, early microvascular abnormalities such as arteriole wall thickening are not detectable in FA. Novel optical technologies permit early detection of both microvascular and neuroretinal changes. The abnormal neuroretinal function may be visualised in spectral domain optical coherence tomography (SDOCT) as thinning of the inner retinal layers [7]. Optical coherence tomography angiography (OCTA) enables high-resolution retinal vasculature imaging; however, disrupted segmentation in the retinal layers may affect the visualisation of the vascular flow.

Adaptive optics (AO) technology is an innovative method that allows non-invasive visualisation and quantification of microcirculation and retinal cells in healthy eyes and eyes with retinal diseases. AO has revolutionised the ways of examining eye structures in vivo. It improves the quality of obtained images by compensating for the wavefront aberrations in the eye with a system of deformable mirrors [8]. A series of electric actuators connected to the mirror deform its surface to modify the light beam and thus effectively remove optical distortion in real-time. AO itself does not create an image; this system must be integrated into existing retinal imaging devices such as fundus camera (FC) or OCT. The first device integrated with the AO to visualise the photoreceptor mosaic is FC-AO- and the first commercially available system is rtx1TM (Imagine Eyes, Orsay, France). Multiple studies have used AO technology in diabetic patients. In 2021, Ueno et al. [9] worked on laser speckle flowgraphy and adaptive optics to prove that retinal vessel wall thickening led to a narrowing of the lumen diameter and a decrease in the blood flow in the PDR group. Zaleska-Zmijewska et al. [10] 2019 demonstrated changes in cone density, regularity and the retinal artery parameters between DR and healthy patients.

Rtx1TM is an AO retinal camera using infrared illumination (wavelength 850 nm) with a resolution of 3.5 μm and a field of view of 4×4 degrees [11]. The area corresponds to an approximately $1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$ square on the retinal surface. The image acquisition time lasts 4 s and permits the capture of 40 individual images [10]. Compared with other diagnostic technologies, the rtx1TM microscope visualises single retinal cells (photoreceptors) and the minor blood vessel structure with the highest possible resolution. The device permits the acquisition of images in any retinal region and the technology software allows for repeated measurements in the same spots. AODetect (for the photoreceptors analysis) and AODetectArtery (for the retinal microvasculature analysis) are two computer programs supplied by the manufacturer to evaluate the rtx-1 retinal spotting.

In the previously published literature, multiple studies have analysed rtx-1 images in diabetic patients [6,9–11]. However, as far as we know, no publications have used rtx1TM technology to assess both cone and retinal microvascular parameters over time in patients with diabetes.

Thus, this study aimed to evaluate the cone density and spacing and retinal vascular changes over a prespecified time of DR duration.

2. Materials and Methods

It was a prospective study, conducted between May 2018 and February 2021 at the Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, the Medical University of Warsaw, located in the Ophthalmic University Hospital in Warsaw. The Bioethical Commission approved the study protocol of the Medical University of Warsaw (approval number KB/87/2015). All investigations adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. All of the study subjects signed a written informed consent form.

2.1. Participants

Patients of the study group were recruited during regular retinal clinical appointments. They were enrolled in the study if the following inclusion criteria were met: age 25–75 and confirmed diagnosis of type-1 or type-2 diabetes mellitus.

The exclusion criteria involved best corrected visual acuity (BCVA) less than 0.5, media opacities to preclude good image quality, no central fixation, history of ocular trauma, history of anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) injections, myopia >6 dioptres or astigmatism >2.50 dioptre cylindrical. Subjects with macular pathologies other than diabetic disease were also excluded from the study.

Participants were divided into two groups: diabetic (type-1 or type-2 diabetes mellitus) and control (healthy subjects). The study group consisted of patients with non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR), classified as the third stage of moderate NPDR according to the International Clinical Disease Severity Scale for DR [3]. The control group consisted of healthy patients of the same age and with the same exclusion criteria as the diabetic group.

Most participants (72%) from the study group had a history of laser photocoagulation; however, laser treatment did not involve the perifoveal retinal area.

An initial group of 50 diabetic patients previously admitted to the laser service at the Ophthalmic Hospital were enrolled in the study between May 2018 and February 2019. The initial diabetic group (DR) included 31 men (62%) and 19 women (38%). All the patients were scheduled to participate in the initial visit and two follow-up appointments one and two years after the study onset. A total of 10 out of 50 subjects did not attend the last control: 2 died, 1 was currently at the surgery ward diagnosed with diabetic foot syndrome and 7 participants resigned due to the COVID-19 pandemic.

The control group consisted of 18 healthy volunteers, all recruited from hospital staff members, including 3 men (16.6%) and 16 women (83.4%).

2.2. Examination Protocol and Parameter Evaluation

The initial appointment included ocular biometry measurements using IOL Master 700 (Carl Zeiss Meditec AG, Hennigsdorf, Germany). Each visit consisted of a comprehensive ophthalmic examination, including refraction and best-corrected visual acuity (BCVA), check (decimal notation), dilated fundus examination, OCT macula scanning (3D DRI OCT Triton) with central retinal thickness (CRT) evaluation and AO retinal image acquisition. The study protocol involved evaluating only one of the subjects' eyes, usually the one with better visual acuity.

AO camera- Rtx1™ (Imagine Eyes, Orsay, France) was used to acquire images of the four perifoveal regions 2° (approximately 540–600 µm) temporally, nasally, superiorly and inferiorly from the fovea centre. The manufacturer set the standardised sampling window size at 80 µm × 80 µm [12]. In cases where high-quality image acquisition was unobtainable, the pupil was dilated by 1% tropicamide (Polfa, Warszawa). Seven patients (14%) from the study group required pupil dilation, whereas none of the control group participants required 1% tropicamide administration.

For the best possible quality accomplishment, we made 3–4 scans of cone regions and arterioles. Frames with significant motion artefacts caused by blinking or eye movements were excluded. Proprietary programs—AOdetect and AOdetectArtery—were provided by the manufacturer to correct distortions within frames and average the frames for the final image production [8].

In photoreceptor visualisation, the software computed the mean cone density per square millimetre of the retinal surface. It analysed the spatial distribution of the detected cells, including intercell spacing and the number of nearest neighbours, using classical Delaunay triangulation and Voronoi tessellation algorithms [11]. The software calculations included the percentage of cone tailing, the optimal hexagonal ($n = 6$) tailing and 4-, 5-, 7-, 8-, >9 tailing.

Retinal vessel measurements included arterioles located temporally—superiorly or inferiorly—with sizes between 70 and 130 µm. As rtx1™ technology enables precise retinal localisation, we analysed the same vessels in the initial and follow-up appointments. We

obtained the vessel diameter (VD), the lumen diameter (LD) and the wall thickness (WT). VD was calculated as the sum of the single arteriolar wall (WT) plus vessel lumen (LD) and single arteriolar wall thickness (WT): $VD = WT + (WT + LD)$. The wall-to-lumen ratio (WLR) was automatically calculated as $WLR = 2 \times WT/LD$; VD and LD usage evaluated the cross-sectional area of the vascular wall (WCSA).

Photoreceptor and retinal parameters were measured in 3 scans; the arithmetic mean of these three values was included in the statistical analysis. We tried eliminating retinal vessels and haemorrhages in the photoreceptor region of choice. The vascular images were recorded at 0.5–1-disc diameter from the optic disc margin, avoiding artery–venous crossings and retinal vein neighbourhoods.

2.3. Statistical Analyses

We obtained four measurements of the perifoveal regions located temporally, nasally, superiorly and inferiorly from the fovea in each investigated eye. The data analysis was performed using Dell Inc. (Austin, TX, USA, 2016) Dell Statistica (data analysis software system), version 13.1. (software.dell.com). Continuous variables, expressed as means \pm SD (standard deviation), were compared between the DR and control groups using the Student's *t*-test (*t*-test) or the Mann–Whitney (M-W) U-test, depending on the distribution pattern. The Shapiro–Wilk (S-W) test was used to confirm or reject the normal distribution of each continuous variable. Relationships between numerical variables were analysed using Pearson correlation analysis when the parametric test condition was met and Spearman correlation analysis when the parametric test condition was not met. The *p*-value was based on the two-sided test, with statistical significance considered as $p < 0.05$.

3. Results

The study protocol involved evaluating only one of the subjects' eyes, usually the one with better visual acuity. The mean (\pm standard deviation) age in the study group was significantly higher than in the control group: 49.7 ± 11.1 vs. 41.6 ± 11.5 ($p = 0.011$ *t*-test; see Table 1). The mean axial length in the DR and the control groups were not significantly different: $23.2 \text{ mm} \pm 1.0 \text{ mm}$ for the right and the left eye in the DR group vs. $23.0 \text{ mm} \pm 1.0 \text{ mm}$ for the right eye and $22.8 \text{ mm} \pm 1.3 \text{ mm}$ for the left eye in the control group ($p = 0.612$ *t*-test for the right eye and $p = 0.339$ *t*-test for the left eye; Table 1). The mean best corrected visual acuity (BCVA) of the investigated eye was significantly lower in the DR group than in the controls in the initial 0.866 ± 0.2 vs. 1.0 ± 0 and final examination 0.828 ± 0.173 vs. 0.983 ± 0.038 , respectively (M-W test $p = 0.002$ initially and $p = 0.003$ finally; Table 1).

Table 1. Group characteristics and results of the blood parameters.

Characteristics	m \pm SD DR	<i>p</i> -Value Wilcoxon Signed Rank Test	m \pm SD Control	<i>p</i> -Value Wilcoxon Signed Rank Test	<i>p</i> -Value <i>t</i> -Test
Age (years)	49.7 \pm 11.1		41.6 \pm 11.5		0.011
Initial Hypertension (%)	23.3	0.043	0.0		0.135 †
Final Hypertension (%)	34.9		0.0		0.033 †
AL-R (mm)	23.2 \pm 1.0	0.416 ‡	23.0 \pm 1.0	0.211 ‡	0.612
AL-L (mm)	23.2 \pm 1.0		22.8 \pm 1.3		0.339
Initial BCVA	0.866 \pm 0.173	0.233	1.000 \pm 0.000	0.109	0.002 †
Final BCVA	0.828 \pm 0.203		0.983 \pm 0.038		0.003 †
Initial BMI (kg/m ²)	27.4 \pm 4.9	0.200	24.2 \pm 1.6	0.006	0.003 †
Final BMI (kg/m ²)	27.1 \pm 4.4		24.8 \pm 1.7		0.026 †
Initial HbA1c (%)	8.3 \pm 1.8	0.507	5.6 \pm 0.6		<0.001 †
Final HbA1c (%)	8.1 \pm 1.8		5.6 \pm 0.6		<0.001 †
Initial FPG (mg/dL)	168.5 \pm 49.8	0.507	93.4 \pm 7.0		<0.001 †
Final FPG (mg/dL)	162.5 \pm 44.7		94.0 \pm 4.9		<0.001 †

† *p*-value Mann–Whitney test; ‡ *p*-value paired *t*-test; m—mean; SD—standard deviation; AL-R axial length of the right eye; AL-L—axial length of the left eye; BCVA—best-corrected vision acuity; BMI—body mass index; HbA1c—glycated haemoglobin A1c; FPG—fasting plasma glucose.

The mean BMI (body mass index) significantly differed between the DR and the control groups in the initial 27.4 ± 4.9 vs. 24.2 ± 1.6 (M-W test $p = 0.003$; Table 1) and final acquisition 27.1 ± 4.4 vs. 24.8 ± 1.7 (M-W test $p = 0.026$; Table 1). Other parameters, including glycated haemoglobin A1c (HbA1c), fasting plasma glucose (FPG) levels, central retinal thickness (CRT) or diagnosed hypertension, are presented in Table 1.

According to the figures presented in Table 1, the initial and final parameters were compared in each group (Table 1). In a 2-year follow-up, statistically relevant changes included a higher percentage of diagnosed hypertension in the DR group and an increase in the mean BMI in the control group (Table 1).

3.1. Cone Parameters

The mean initial cone density was significantly lower in the DR group in comparison with the control group in all four retinal locations: $20,380 \pm 4652$ vs. $25,652 \pm 2513$ in the temporal, $20,203 \pm 4775$ vs. $25,165 \pm 3261$ in the nasal, $19,680 \pm 4902$ vs. $24,059 \pm 2846$ in the superior and $19,980 \pm 4652$ vs. $23,481 \pm 3959$ in the inferior quadrant (Table 2).

Table 2. Initial and final cone density in 4 retinal locations in the DR and the control groups.

Quadrants	Initial Visit			Final Visit			p-Value Paired t-Test DR	p-Value Paired t-Test Control
	MCD (\pm SD) (cone/mm ²) DR	MCD (\pm SD) (cone/mm ²) Control	p-Value t-Test	MCD (\pm SD) (cone/mm ²) DR	MCD (\pm SD) (cone/mm ²) Control	p-Value t-Test		
T	20,380 *** \pm 4652	25,652 *** \pm 2513	<0.001	19,412 *** \pm 5049	23,920 *** \pm 3037	0.001	<0.001	0.002
N	20,203 *** \pm 4775	25,165 *** \pm 3261	<0.001	19,634 *** \pm 4521	24,031 *** \pm 2902	<0.001	<0.001	0.037
S	19,680 *** \pm 4902	24,059 *** \pm 2846	<0.001	18,491 *** \pm 4841	22,768 *** \pm 2826	0.001	<0.001	0.043
I	19,980 ** \pm 4652	23,481 * \pm 3959	0.007	19,047 * \pm 5270	21,885 * \pm 3992	0.047	<0.001	<0.001

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.001$; MCD—mean cone density; SD—standard deviation; T—temporal; N—nasal; S—superior; I—inferior.

For the final visit, the mean cone density was significantly lower in the DR group in comparison with the control group in all four retinal locations: $19,412 \pm 5049$ vs. $23,920 \pm 3037$ in the temporal, $19,634 \pm 4521$ vs. $24,031 \pm 2902$ in the nasal, $18,491 \pm 4841$ vs. $22,768 \pm 2826$ in the superior and $19,047 \pm 5270$ vs. $21,885 \pm 3992$ in the inferior quadrant. The results are presented in Table 2.

In a 2-year follow-up, the mean final cone density significantly decreased in all four locations in both groups (in consecutive quadrants $p \leq 0.001$; <0.001 ; <0.001 and 0.002 ; 0.037 ; 0.043 ; <0.001 , respectively, in the DR and the control group; Table 2).

The mean initial interphotoreceptor spacing (SM) was significantly higher in all quadrants in the DR group compared with the controls ($p < 0.05$; Table 3). According to Table 3, the mean final SM difference between both groups was statistically relevant apart from the inferior quadrant.

Table 3. Initial and final interphotoreceptor spacing in 4 retinal locations in the DR and the control groups.

Quadrants	Initial Visit			Final Visit			p-Value Paired t-Test DR	p-Value Paired t-Test Control
	SM (\pm SD) (μ m) DR	SM (\pm SD) (μ m) Control	p-Value t-Test	SM (\pm SD) (μ m) DR	SM (\pm SD) (μ m) Control	p-Value t-Test		
T	7.84 *** \pm 0.90	6.96 *** \pm 0.42	<0.001	8.06 ** \pm 1.11	7.25 ** \pm 0.56	0.003	<0.001	0.001
N	7.88 *** \pm 0.94	7.01 *** \pm 0.48	<0.001	7.95 ** \pm 0.9	7.24 ** \pm 0.63	0.006	0.002	0.160
S	7.99 *** \pm 0.98	7.14 *** \pm 0.41	0.001	8.24 ** \pm 1.1	7.35 ** \pm 0.47	0.004	<0.001	0.063
I	7.91 * \pm 0.92	7.28 * \pm 0.64	0.012	8.11 \pm 1.12	7.49 \pm 0.71	0.063	0.002	0.010

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; SM—interphotoreceptor spacing; SD—standard deviation; T—temporal; N—nasal; S—superior; I—inferior.

In a 2-year follow-up, the mean interphotoreceptor spacing (SM) increased in the examined groups in all four retinal locations (in the consecutive quadrants $p \leq 0.001$; 0.002 ;

<0.001; 0.002 and 0.032; 0.606; <0.001; 0.208, respectively, in the DR and the control group; Table 3).

According to Table 4, when comparing the DR group and the controls, there was a significant difference between the cone regularity in the temporal quadrant in the initial trial and the nasal quadrant in the final test ($p < 0.05$). Moreover, in the 2-year observation, the mean cone regularity significantly decreased in most of the retinal locations in the DR group ($p < 0.05$, Table 4).

Table 4. Initial and final cone regularity in 4 retinal locations in the DR and the control groups.

Quadrants	Initial Visit			Final Visit			<i>p</i> -Value Paired <i>t</i> -Test DR	<i>p</i> -Value Paired <i>t</i> -Test Control
	Reg (\pm SD) (%) DR	Reg (\pm SD) (%) Control	<i>p</i> -Value <i>t</i> -Test	Reg (\pm SD) (%) DR	Reg (\pm SD) (%) Control	<i>p</i> -Value <i>t</i> -Test		
T	91.2 \pm 3.6	93.3 \pm 3.3	0.042	89.4 \pm 5.3	90.7 \pm 4.1	0.343	<0.001	0.032
N	90.9 \pm 3.8	92.4 \pm 4.7	0.212	90.4 \pm 4.2	93.0 \pm 2.8	0.023	0.002	0.606
S	82.3 \pm 10.0	85.4 \pm 7.0	0.244	91.5 \pm 5.2	92.7 \pm 4.4	0.419	<0.001	<0.001
I	92.1 \pm 4.0	93.8 \pm 3.4	0.129	89.9 \pm 5.0	92.5 \pm 4.9	0.103	0.002	0.208

* $p < 0.05$; Reg—cone regularity; SD—standard deviation; T—temporal; N—nasal; S—superior; I—inferior.

The regularity of cones was additionally assessed by the mean percentage of Voronoi tiles (N%6), with significantly lower results initially in the temporal, nasal and superior quadrant in the DR group compared with the controls ($p < 0.05$; Table 5). However, in the final trial, Voronoi tile values significantly differed in both groups in the nasal and superior location ($p < 0.05$; Table 5).

Table 5. Initial and final percentage of hexagonal cones (6-Voronoi) in 4 retinal locations in the DR and the control groups.

Quadrants	Initial Visit			Final Visit			<i>p</i> -Value Paired <i>t</i> -Test DR	<i>p</i> -Value Paired <i>t</i> -Test Control
	6-Voronoi (\pm SD) (%) DR	6-Voronoi (\pm SD) (%) Control	<i>p</i> -Value <i>t</i> -Test	6-Voronoi (\pm SD) (%) DR	6-Voronoi (\pm SD) (%) Control	<i>p</i> -Value <i>t</i> -Test		
T	42.8 \pm 5.1	46.8 \pm 6.9	0.013	40.9 \pm 7.0	41.1 \pm 6.7	0.946	0.073	0.011
N	44.1 \pm 4.9	44.2 \pm 7.4	0.026 [†]	39.8 \pm 6.5	47.6 \pm 7.8	0.001 [†]	<0.001 [‡]	0.233
S	43.8 \pm 6.9	49.0 \pm 13.4	0.020 [†]	40.1 \pm 8.5	46.9 \pm 9.7	0.011	<0.001 [‡]	0.979
I	44.0 \pm 6.3	45.8 \pm 7.1	0.340	41.1 \pm 7.7	44.8 \pm 9.4	0.160	0.002	0.743

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; [†] *p*-value Mann–Whitney test; [‡] *p*-value Wilcoxon signed rank test; 6-Voronoi—a percentage of hexagonal cones; SD—standard deviation; T—temporal; N—nasal; S—superior; I—inferior.

Compared with the initial acquisition, the mean final percentage of hexagonal cones was significantly lower in all four retinal locations in the DR group, whereas only in the temporal quadrant in the control group ($p < 0.05$; Table 5).

3.2. Retinal Artery Parameters

The mean initial lumen and the total diameter of the analysed retinal artery did not significantly differ between groups ($p > 0.05$; Table 6), even though initially the mean of both artery walls (wall 1 and wall 2) was thicker and the mean WLR and WCSA values were significantly higher in the DR group compared with the controls ($p < 0.05$; Table 6).

In the 2-year follow-up, the increase in WCSA and WLR and the mean value of artery walls was observed in the DR group; nevertheless, a statistically significant difference concerned only the mean value of artery wall 1 (14.5 \pm 2.5 vs. 15.1 \pm 2.3 ($p = 0.009$)) and wall 2 (14.6 \pm 2.4 vs. 15.1 \pm 2.3 ($p = 0.025$)) in the initial and final acquisition, respectively (Table 6). The control group observation revealed significant differences in the retinal artery measurements, including increases in the mean value of artery walls and WCSA and WLR parameters (see Table 6). However, the final WLR measurements of the controls remained within the normal range.

Table 6. Initial and final retinal artery measurements in 2-year observation time in the DR and the control groups.

Quadrants	Initial Visit			Final Visit			p-Value Paired t-Test DR	p-Value Paired t-Test Control
	M (±SD) DR	M (±SD) Control	p-Value t-Test	M (±SD) DR	M (±SD) Control	p-Value t-Test		
LD (±SD) (µm)	92.6 ± 18.7	95.9 ± 10.4	0.495	90.4 ± 13.5	95.9 ± 13.2	0.155	0.180	0.495
VD (±SD) (µm)	119.0 ± 17.4	120.0 ± 13.2	0.836	120.8 ± 17.2	120.5 ± 15.1	0.953	0.773	0.836
WALL1 (±SD) (µm)	14.5 *** ± 2.5	12.0 *** ± 1.9	<0.001 †	15.1 *** ± 2.3	12.3 *** ± 1.8	<0.001	0.009 ‡	<0.001
WALL2 (±SD) (µm)	14.6 *** ± 2.4	12.0 *** ± 1.5	<0.001 †	15.1 *** ± 2.3	12.6 *** ± 1.7	<0.001	0.025 ‡	<0.001
WCSA (±SD) (µm ²)	4938 * ± 1358	4122 * ± 979	0.033 †	5081 * ± 1254	4268 * ± 978	0.017	0.480 ‡	0.033
WLR (±SD)	0.342 *** ± 0.063	0.251 *** ± 0.015	<0.001 †	0.343 *** ± 0.048	0.262 *** ± 0.032	<0.001	0.202 ‡	<0.001 †

* p < 0.05; *** p < 0.001; † p-value Mann-Whitney test; ‡ p-value Wilcoxon signed rank test; M—mean; SD—standard deviation; LD—lumen diameter; VD—vessel diameter; WLR—wall-to-lumen ratio; WCSA—cross-sectional wall area.

Figures 1 and 2 were taken from a DR patient in the initial part of the study and during a 2-year follow-up. Images present lower cone density, regularity and higher interphotoreceptor spacing (SM) after the follow-up period. Microvascular changes shown in Figure 2 include thickening of the arteriole walls and increased WLR and WCSA in the 2-year observation time.

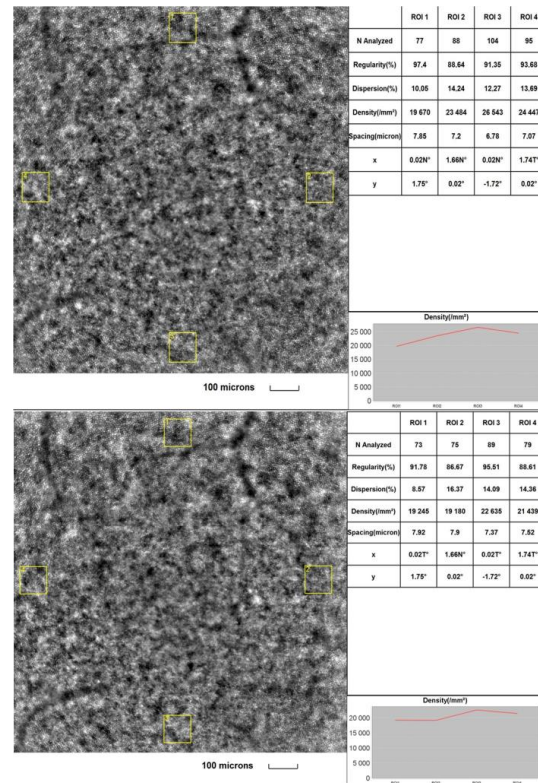


Figure 1. Image of the macular region with four retinal acquisitions, ROI (region of interest) for a DR patient initially (upper) and after a 2-year time (lower) captured by rtx1™ AO retinal camera. Cone analysis included: regularity (%), dispersion (%), density (cone/mm²) and spacing (µm).

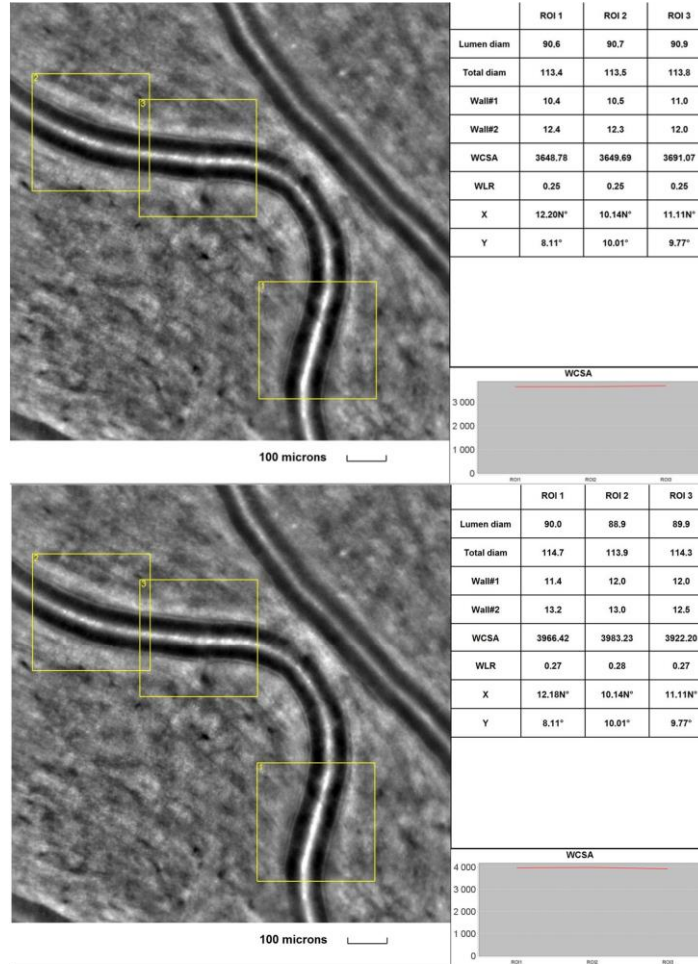


Figure 2. Image of the retinal artery of a DR patient captured by rtx1™ AO retinal camera in three different acquisitions: ROI (region of interest), initially (**upper**) and after a 2-year observation time (**lower**). The charts present the following parameters: Lumen diam—lumen diameter; Total diam—total diameter; wall1 and wall2, WCSA—cross-sectional wall area; —WLR—wall-to-lumen ratio.

3.3. Visual Acuity, Hba1c, FPG, CRT, Age, BMI Correlations

The relationships between changes in cone and retinal artery parameters and factors such as visual acuity, Hba1c, FPG, CRT, age and BMI were determined with Pearson correlation coefficients in the DR group (Table 7). There was a correlation between BCVA deterioration and interphotoreceptor spacing (SM) changes (cone density decreases $r = 0.6200$ and $r = -0.6779$, respectively). Both parameters' changes correlated with age ($r = -0.4639$ for cone density and $r = 0.4014$ for cone spacing (SM)). In contrast, other factors, such as CRT, Hba1c and BMI, presented no apparent correlation with the cone or retinal artery measurements.

Table 7. Correlation between changes in BCVA, CRT, HbA1c, FPG, age, BMI and cone and vascular parameters in the 2-year-time observation using Pearson correlation analysis.

Change between Final and Initial Acquisition	BCVA	CRT	Hba1c	FPG	Age	BMI
MCD	0.6200	−0.0804	0.0804	0.1647	−0.4639	−0.1103
SM	−0.6779	0.1385	−0.0113	−0.0977	0.4014	0.0602
Reg	0.1102	0.0860	−0.0680	−0.0599	−0.3150	−0.0986
6-Voronoi	0.1894	0.0886	0.0752	−0.0465	−0.1154	−0.0792
LD	−0.3572	0.1484	0.0040	−0.1453	0.0978	0.2308
VD	−0.2344	0.1538	0.0189	−0.1970	0.2123	0.2552
WALL1	−0.1344	0.0681	0.1624	−0.0692	0.2504	0.0162
WALL2	0.1387	0.1090	0.2105	−0.1347	0.2309	0.1706
WCSA	−0.2022	0.1559	0.1507	−0.1105	0.2363	0.0960
WLR	0.3389	−0.1664	0.1353	0.0941	−0.0856	−0.0150

BCVA—best-corrected vision acuity; CRT—central retinal thickness; Hba1c—glycated haemoglobin A1c; FPG—fasting plasma glucose; BMI—body mass index; MCD—mean cone density; SM—interphotoreceptor spacing; Reg—cone regularity; 6-Voronoi—the percentage of hexagonal cones; LD—lumen diameter; VD—vessel diameter; WLR—wall-to-lumen ratio; WCSA—wall cross-sectional area.

4. Discussion

This study used the rtx-1 AO fundus camera to assess and compare cone density and retinal microvasculature in the 2-year follow-up period in diabetic and healthy volunteers. The study included central retinal thickness measurements, BCVA, BMI evaluation and blood parameters analysis.

Our findings indicated that cone density was significantly lower in the DR group than in the control group in all four retinal quadrants. The research confirmed the previous studies' results [10,11,13–16], indicating a difference in the photoreceptor counts between healthy and diabetic patients. Lammer et al. [6] proved no relevant change in the cone density and spacing in DR; however, their study emphasised a consistent association between the regularity of cone arrangement and DR presence.

We did not observe significant differences in cone parameters in the DR group in all four retinal locations. These results were similar to the findings of multiple previous studies [10,13,17,18]. In contrast with our findings, Cristescu et al. 2019 proved an asymmetry between the cone density in horizontal and vertical meridians in DR and the control group [14]; the authors indicated that the higher density of cones in the horizontal line might be explained by the vision usage while reading. Moreover, in our study, the control group presented a variability of cone density in four meridians (Table 2). In line with our findings, Zaleska-Zmijewska et al. and Park et al. stated that the highest density of cones among healthy patients was in the temporal quadrant [17,19]. Further studies must determine this issue because of the discrepancy between cone densities across retinal meridians in diabetic and healthy subjects.

Our study revealed increased interphotoreceptor spacing distance, decreased regularity and cone rearrangement mosaic (evaluated by the percentage of hexagonal cones) in DR patients compared with controls. Previous analyses indicated the same results [6,10,13]. Lammer et al. suggested that the cone regularity and mosaic changes may result from retinal cell swelling in diabetic macular oedema (DME) [6]. As DME is related to photoreceptor layer disruption [20], the history of DME may cause cone density loss. However, our study eliminated a possible influence of DME on cone mosaic by excluding participants with previous anti-VEGF treatment. Apart from macular oedema, cone spacing and regularity may be affected by retinal pathologies such as intraretinal cysts, extracellular fluid accumulation, haemorrhages and hard exudates that may commonly appear in diabetes [10].

It is commonly known that microvascular architecture is affected by glucose levels and blood pressure. In our study, in the microvasculature analysis, we observed thicker artery walls, higher WLR and higher WCSA in diabetic patients than in healthy ones, with no significant difference in the lumen and external diameter. Similar results were presented by Ueno et al., suggesting that the stiffening of the collagen may cause vascular wall changes

in diabetic patients due to advanced glycosylated products with collagen cross-linking and by the growth of the muscle cells [9]. Our study involved an inquiry about coexisting hypertension, but further examination using AO technology should be performed to assess blood pressure influence on vascular changes in diabetic patients.

No other studies have analysed both cone and retinal changes over time among DR and healthy patients. After two years of our research, we observed a significantly lower cone density in the DR group compared with the controls. Moreover, we found a lower correlation between cone densities in the retinal quadrants in the diabetic group. It may suggest that the illness duration can be associated with a higher diversity of cone parameters between different retinal locations.

In our 2-year-time study, we detected that an increase in interphotoreceptor spacing cone regularity was significantly lower in all retinal locations in the examined group. As was previously stated, no other observational studies have assessed changes in cone density and arrangement in time; however, some papers have noted no correlation between cone density and the duration of diabetes [6,13]. Our findings indicated lower cone density in healthy and diabetic patients over time. Some authors have found a relationship between cone parameters and age factors, but others have not found such correlations [6,19,21]. Our study found that changes in the cone density measured over time were more minor in the DR group than in the controls. Sex inequality in the DR and the control group was considered a potential reason for the cone changes' disproportion; nevertheless, multiple studies deny sex influence on cone density [14,17].

Most differences in microvasculature parameters in the 2-year time in our study group were slight and not statistically significant. The results may correspond with stable HbA1c and FPG levels in the DR group, which indicated well-controlled diabetes in our study group. There are no other studies analysing microvasculature retinal changes occurring over time in diabetic and healthy patients, so it was complicated to compare our results. However, studies have proven that the severity of diabetes significantly affects lumen diameters and WLR [9,22,23]. It has been confirmed that photocoagulation leads to retinal vessel narrowing, autoregulatory vasoconstriction and reduced retinal blood flow [24,25]. Moreover, Sugimoto et al. stated that anti-VEGF agents are responsible for ocular blood flow diminishment [26]; thus, our study excluded patients with a history of anti-VEGF treatment. The vascular changes in the control group may have been determined by an increase in BMI, consistent with other previously published studies [12,27].

In the 2-year time analysis, we have proven a significant relationship between BCVA decrease, age augmentation and deterioration of the AO parameters. Our findings align with the results of Cheng et al., who demonstrated greater cone density and smaller spacing in patients with better BCVA [28]. Age factor was already discussed in this article, mentioning various study research opinions. Morphological variables in the diabetic group were not significantly related to HbA1c levels. Our results were similar to those of several other authors [9,10,13]; however, Lombardo et al. [15] and Arichika et al. [23] demonstrated significant relation between cone and vascular morphology with HbA1c changes.

Study Limitations

This study faced several limitations. First of all, the study size could have been more significant. It was mainly due to the difficulty in recruiting diabetic patients without lens opacification and macular oedema, which can interfere with eye fixation and precise AO image acquisition. Because the study was conducted between 2018 and 2021, the sample size was affected by the COVID-19 epidemic situation. Secondly, the rtx-1 did not allow for assessing the density of tightly packed cones in the centre of the fovea, so it remained questionable whether the perifoveal cone loss corresponded to the centre of the fovea [13]. Finally, the control group was relatively small, with sex and age imbalances, mainly because of restricted exclusion criteria, no history of widespread diseases and the unstable pandemic.

5. Conclusions

This study revealed significant differences in mean cone density, mosaic arrangement and microvascular morphology between healthy and diabetic patients. In the 2-year follow-up period, we detected photoreceptor loss and rearrangement in both groups. We found a trend toward vascular morphological changes occurring over time in diabetic patients and controls. To thoroughly compare changes in microvasculature and photoreceptor loss in the duration of the disease, future studies with a larger sample size should be conducted. This study may provide more insight into the DR progression assessment, with the potential for earlier detection of diabetic pathologies.

Author Contributions: Conceptualization, J.P.S. and A.Z.-Ż.; methodology, A.Z.-Ż. and Z.M.W.; software, M.K. and Z.M.W.; validation, A.Z.-Ż., M.K. and Z.M.W.; formal analysis, A.Z.-Ż. and M.K.; investigation, M.K. and A.Z.-Ż.; resources, M.K.; data curation, M.K.; original draft preparation, M.K. and Z.M.W.; writing, M.K., A.Z.-Ż. and Z.M.W., review and editing, M.K., J.P.S. and A.Z.-Ż.; visualisation, J.P.S. and A.Z.-Ż.; supervision, A.Z.-Ż.; project administration, J.P.S.; funding acquisition, J.P.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted by the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Warsaw (KB/87/2015, 7 April 2015).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data sets used and analysed during this study are available from the corresponding author in consideration of potentially applying restrictions on reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declared no conflict of interest. None of the authors had any financial interest concerning the presented subject.

References

1. Saeedi, P.; Petersohn, I.; Salpea, P.; Malanda, B.; Karuranga, S.; Unwin, N.; Colagiuri, S.; Guariguata, L.; Motala, A.A.; Ogurtsova, K.; et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2019**, *157*, 107843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Pascolini, D.; Mariotti, S.P. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br. J. Ophthalmol.* **2012**, *96*, 614–618. [[CrossRef](#)]
3. Wilkinson, C.P.; Ferris, F.L.; Klein, R.E.; Lee, P.P.; Agardh, C.D.; Davis, M.; Dils, D.; Kmapik, A.; Pararajasegaram, R.; Verdaguer, J.T.; et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular oedema disease severity scales. *Ophthalmology* **2003**, *110*, 1677–1682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs- an extension of the modified Airlie House Classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology* **1991**, *98*, 786–806. [[CrossRef](#)]
5. Simó, R.; Hernández, C.; European Consortium for the Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR). Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol. Metab.* **2014**, *25*, 23–33. [[CrossRef](#)]
6. Lammer, J.; Prager, S.G.; Cheney, M.C.; Ahmed, A.; Radwan, S.H.; Burns, S.A.; Silva, P.S.; Sun, J.K. Cone photoreceptor irregularity on adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy correlates with severity of diabetic retinopathy and macular edema. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57*, 6624–6632. [[CrossRef](#)]
7. Wojtkowski, M.; Leitgeb, R.; Kowalczyk, A.; Bajraszewski, T.; Fercher, A.F. In vivo human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* **2002**, *7*, 457–463. [[CrossRef](#)]
8. Lombardo, M.; Parravano, M.; Serrao, S.; Ducoli, P.; Stripe, M.; Lombardo, G. Analysis of retinal capillaries in patients with type 1 diabetes and non-proliferative diabetic retinopathy using adaptive optics imaging. *Retina* **2013**, *33*, 1630–1639. [[CrossRef](#)]
9. Ueno, Y.; Iwase, T.; Goto, K.; Tomita, R.; Ra, E.; Yamamoto, K.; Terasaki, H. Association of changes of retinal vessels diameter with ocular blood flow in eyes with diabetic retinopathy. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 4653. [[CrossRef](#)]
10. Zaleska-Żmijewska, A.; Wawrzyniak, Z.M.; Dąbrowska, A.; Szaflik, J.P. Adaptive Optics (rtx1) High-Resolution Imaging of Photoreceptors and Retinal Arteries in Patients with Diabetic Retinopathy. *J. Diabetes Res.* **2018**, *2019*, 9548324. [[CrossRef](#)]
11. Ro-Mase, T.; Ishiko, S.; Omae, T.; Ishibazawa, A.; Shimouchi, A.; Yoshida, A. Association Between Alterations of the Choriocapillaris Microcirculation and Visual Function and Cone Photoreceptors in Patients with Diabetes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2020**, *61*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Zaleska-Żmijewska, A.; Wawrzyniak, Z.; Kupis, M.; Szaflik, J.P. The Relation between Body Mass Index and Retinal Photoreceptor Morphology and Microvascular Changes Measured with Adaptive Optics (rtx1) High-Resolution Imaging. *J. Ophthalmol.* **2020**, *2021*, 6642059. [[CrossRef](#)]
13. Soliman, M.K.; Sadiq, M.A.; Agarwaletal, A. High-resolution imaging of parafoveal cones in different stages of diabetic retinopathy using adaptive optics fundus camera. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cristescu, I.E.; Baltă, F.; Zăgrean, L. Cone photoreceptor density in type 1 diabetic patients Irina Cristescu 2019 Romanian Journal of Ophthalmology. *Rom. J. Ophthalmol.* **2019**, *63*, 153–160. [[CrossRef](#)]
15. Lombardo, M.; Parravano, M. Adaptive optics imaging of parafoveal cones in type 1 diabetes. *Retina* **2014**, *34*, 546–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Tan, W.; Wright, T.; Rajendran, D. Cone–Photoreceptor Density in Adolescents with Type 1 Diabetes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2015**, *56*, 6339–6343. [[CrossRef](#)]
17. Park, S.P.; Chung, J.K.; Greenstein, V.; Tsang, S.H.; Chang, S. A study of factors affecting the human cone photoreceptor density measured by adaptive optics. *Exp. Eye Res.* **2013**, *108*, 1–9. [[CrossRef](#)]
18. Legras, R.; Gaudric, A.; Woog, K. Distribution of cone density, spacing and arrangement in adult healthy retinas with adaptive optics flood illumination. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191141. [[CrossRef](#)]
19. Zaleska-Zmijewska, A.; Wawrzyniak, Z.M.; Ulińska, M.; Szaflik, J.; Dabrowska, A.; Szaflik, J.P. Human photoreceptor cone density measured with adaptive optics technology (rtx-1). *Medicine* **2017**, *96*, e7300. [[CrossRef](#)]
20. Murakami, T.; Yoshimura, N. Structural changes in individual retinal layers in diabetic macular edema. *J. Diabetes Res.* **2013**, *2013*, 920713. [[CrossRef](#)]
21. Song, H.; Chui, T.; Zhong, Z.; Elsner, A.E.; Burns, S.A. Variation of cone photoreceptor. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 7376–7384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Klein, R.; Klein, B.E.; Moss, S.E.; Wong, T.Y.; Sharrett, A.R. Retinal vascular caliber in persons with type 2 diabetes: The Wisconsin Epidemiological Study of Diabetic Retinopathy: XX. *Ophthalmology* **2008**, *115*, 1859–1868. [[CrossRef](#)]
23. Arichika, S.; Uji, A.; Murakami, T.; Suzuma, K.; Gotoh, N.; Yoshimura, N. Correlation of retinal arterial wall thickness with atherosclerosis predictors in type 2 diabetes. *Br. J. Ophthalmol.* **2017**, *101*, 69–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wilson, C.A.; Stefánsson, E.; Klombers, L.; Hubbard, L.D.; Kaufman, S.C.; Ferris, F.L. Optic disk neovascularisation and retinal vessel diameter in diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **1988**, *106*, 131–134. [[PubMed](#)]
25. Stefánsson, E. Ocular oxygenation and the treatment of diabetic retinopathy. *Surv. Ophthalmol.* **2006**, *51*, 364–380. [[CrossRef](#)]
26. Sugimoto, M.; Nunome, T.; Sakamoto, R.; Kobayashi, M.; Kondo, M. Effect of intravitreal ranibizumab on the ocular circulation of the untreated fellow eye. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2017**, *255*, 1543–1550. [[CrossRef](#)]
27. De Jongh, R.T.; Serné, E.H.; IJzerman, R.G.; Vries, F.; Stehouwer, C.D.A. Impaired microvascular function in obesity. *Circulation* **2004**, *109*, 2529–2535. [[CrossRef](#)]
28. Cheng, H.; Ciuffreda, K.J.; Jiang, H.; Zhou, K.; Lin, S.; Zheng, J.; Yu, X. Cone parameters in different vision levels from the adaptive optics imaging. *Medicine* **2020**, *100*, e25618. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Omówienie:

W 2-letniej obserwacji, wykorzystując technologię optyki adaptatywnej, wykonano skany przy pomocy funduskamery rtx1TM. Porównano zmianę morfologii, gęstości czopków oraz zmianę morfologii naczyń siatkówki w grupie pacjentów cukrzycowych z wynikami zdrowych pacjentów.

Już na początku badania udowodniono, iż gęstość czopków pacjentów z cukrzycą była istotnie mniejsza niż w grupie kontrolnej. Wyniki były zgodne z opublikowanymi wcześniej doniesieniami [14, 48-52]. W grupie badanej nie zauważano istotnej statystycznie różnicy w gęstości czopków między poszczególnymi kwadrantami, co zgadzało się z obserwacjami innych autorów [14, 53]. Udowodniono, że rozpoznanie cukrzycy wpływa na parametry czopków- w tym regularność czy międzyfotoreceptorowe odstępy. W grupie kontrolnej zauważono największą gęstość czopków w kwadrancie skroniowym, co wcześniej zaobserwowano w innych pracach [54].

Posługując się techniką optyki adaptatywnej, zauważono różnice w morfologii naczyń pacjentów cukrzycowych i zdrowych osób. Podobne wnioski prezentowano we wcześniejszych badaniach, w których zachodzące zmiany tłumaczono wpływem wysokiego poziomu glukozy na strukturę włókien kolagenowych oraz komórek mięśniowych ściany naczyń [55].

Innowacyjność powyższego badania polegała na tym, iż nikt wcześniej nie porównywał jednocześnie zmian fotoreceptorowych i mikronaczyniowych, zachodzących w toku trwania cukrzycy. W 2-letniej obserwacji parametry czopkowe uległy większym zmianom w grupie badanej niż w grupie kontrolnej. Zaprzeczyło to wcześniejszym doniesieniom o braku wpływu czasu trwania cukrzycy na gęstość czopków [56].

Powyższe badanie udowodniło istotne zwiększenie grubości ścian naczyń i WLR w toku trwania choroby. Wyniki te są zgodne z dotychczas istniejącymi publikacjami, donoszącymi o wpływie zaawansowania cukrzycy na stan naczyń siatkówki [57-58].

Badano oddziaływanie zmian ostrości wzroku, poziomu glukozy, hemoglobiny glikowanej (HbA1c), BMI oraz wieku na parametry fotoreceptorowe i naczyniowe. Udowodniono, iż większość wymienionych czynników pozostawała bez wpływu na wyniki obserwacji prowadzonych za pomocą rtx1TM. Niemniej jednak, w grupie badanej zauważono korelację spadku gęstości czopków z pogorszeniem ostrości wzroku. Podobną zależność prezentowano we wcześniejszych badaniach [59].

2.4 Artykuł: „Novel therapies for diabetic retinopathy”

Rutynowo leczenie retinopatii cukrzycowej polega na normalizacji poziomu glikemii (za pomocą leków doustnych i insulinoterapii), laserowej fotokoagulacji siatkówki oraz doszklistkowej terapii preparatami anty-VEGF. W określonych przypadkach, takich jak przewlekły krwotok doszklistkowy czy odwarstwienie siatkówki, metodą z wyboru jest operacja witrektomii z jednoczasową fotokoagulacją siatkówki i podaniem przeciwciała anty-VEGF.

Analizowano rolę terapii, obniżającej ciśnienie tętnicze krwi oraz leków hipolipemizujących w hamowaniu rozwoju i progresji retinopatii cukrzycowej [24, 60, 61, 62]. Wyniki badań nie udowodniły jednoznacznego wpływu nadciśnienia tętniczego i dyslipidemii na nasilenie cukrzycowych zmian na dnie oka. Rola terapii hipotensyjnej i hipolipemizującej w leczeniu DR pozostaje kontrowersyjna.

Innowacyjne leczenie retinopatii cukrzycowej oparte jest na alternatywnych substancjach, takich jak: kininogenaza pochodzenia trzustkowego, antyoksydanty (dobesylan wapnia (ang. *calcium dobesilate*- CaD), N-acetylocysteina (ang. *N-acetylcysteine*- NAC)), kurkumina) czy skwalamina. Protekcyjny efekt wymienionych preparatów polega na hamowaniu angiogenezy i zmniejszeniu stresu oksydacyjnego [37,38,63].

Trwają badania nad innymi, nowoczesnymi możliwościami terapeutycznymi retinopatii cukrzycowej. Pozytywne doniesienia dotyczą terapii genowej, zastosowania mezenchymalnych komórek macierzystych, przeszczepów wysepek trzustkowych czy doustnych inhibitorów SGLT2 (ang. *Sodium-dependent glucose transporter 2*) [64-67].

Praca Poglądowa.

Novel therapies for diabetic retinopathy

MAGDALENA KUPIS¹, KATARZYNA SAMELSKA¹, JACEK SZAFLIK¹, PIOTR SKOPÍŃSKI²

¹Department of Ophthalmology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

²Department of Histology and Embryology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by high blood glucose levels as well as microvascular and macrovascular changes. According to the latest statistics the growth of DM incidence is very fast. Diabetic retinopathy (DR) – one of the common DM complications – is the leading cause of blindness among professionally active people. Traditional treatment of DR including drugs controlling hyperglycemia, laser therapy, vitrectomy, and intravitreal injections of anti-VEGF is effectively administered with the effect of neovascularization and macular edema prevention. However, new potential DR therapies – focusing on a longer therapeutic effect and potentially fewer side effects – are being widely investigated. Gene therapy – targeting retinal vasculopathy or targeting retinal protection, mesenchymal stem cell injections, SGLT2 inhibitors, and islet cell transplantation have been proved to stop DR progression. The majority of the new treatment research was performed on an animal model and did not reach the final study stage. A further future human model and randomized studies with optimized delivery vectors will hopefully confirm positive outcomes of the new DR therapies.

Key words: diabetic retinopathy, gene therapy, mesenchymal stem cells, SGLT2 inhibitors, islet cell transplantation.

(*Cent Eur J Immunol* 2022; 47 (1): 102-108)

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a rapidly growing chronic metabolic disease. DM onset and progression are related to hyperglycemia, microvascular and macrovascular complications caused by insulin secretion defect and/or its biological function disorder [1]. DM is divided into 3 main groups: DM type 1, type 2, and gestational DM [2]. Type 1 DM is caused by an autoimmune condition attacking the patient's own insulin-producing beta cells, type 2 DM develops from gradual insulin insensitivity and a decrease in insulin production [1]. Gestational DM is only diagnosed in pregnant women and shares similar pathophysiology with type 2 DM [2]. A significant growth of DM incidence is being observed. According to a prevalence study in 2019 there were approximately 463 million DM patients globally and this figure was expected to increase to 700 million patients in the following 25 years [3].

Long term progression of the disease affects critical organs' functions. Diabetic retinopathy (DR) is one of the common complications of diabetes. Hyperglycemia can damage the blood-retinal barrier and cause leakage of blood from the central retinal artery, ciliary vessels, and the deep layers of the retina, which triggers ischemic changes in the surrounding retina [4]. The local retinal ischemia causes proliferation of new vessels, which can lead to tractional retinal detachment and resultant vision

loss. With successful general diabetic treatment vision acuity can be maintained at an acceptable level. However, according to Semeraro *et al.* blindness will inevitably occur in about 10% of DR patients [5].

Diabetic retinopathy is divided into non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) and proliferative diabetic retinopathy (PDR). Currently two categories are classified into six stages. Nonproliferative diabetic retinopathy (NPDR) includes stage I: microangioma and small bleeding points, stage II: hard exudates, and stage III: cotton wool spots. Proliferative diabetic retinopathy (PDR) includes stage IV: neovascularization, vitreous hemorrhage, stage V: fibrovascular proliferation, vitreous organization, and stage VI: retinal detachment and resultant blindness caused by stretching [4]. Patients with NPDR are usually asymptomatic and they do not complain about any vision problems. However, when visual impairment occurs, the effectiveness of NPDR treatment is poor [6]. In comparison to NPDR, PDR can cause severe vision loss and lead to complete blindness. Prevalence of DR inevitably corresponds to DM duration. Some research proved that NPDR was present in 25% of patients in 5 years after DM diagnosis, in 60% at 10 years and 80% at 15 years [7]. On the other hand, PDR was found in 2% of patients with DM duration of less than 5 years and in 15.5% of patients who had DM for 15 years or more [8].

Correspondence: Magdalena Kupis, Department of Ophthalmology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland,
e-mail: magdalennakupis@gmail.com
Submitted: 8.07.2021; Accepted: 28.09.2021

Traditional therapies for diabetic retinopathy

Traditional DR therapies include laser therapy, vitrectomy and drugs including anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) components and steroids. Supplementary treatment involves controlling glucose, lipid blood levels and hypertension treatment.

Anti-VEGF intravitreal injections are useful in visual acuity improvement in patients with diabetic macular edema (DME). Moreover, the injections are proved to be as effective as panretinal photocoagulation at controlling the complications of PDR, with fewer side effects [9]. Aflibercept, bevacizumab and ranibizumab are the three main types of anti-VEGF agents, but only aflibercept and ranibizumab are authorized for use in DME treatment [10]. Recently new drugs such as brolicizumab, faricimab, and conbercept are being tested in clinical trials as potential next-generation anti-VEGF treatment for DME [11].

DR treatment involves intravitreal injections of steroids – triamcinolone acetonide, fluocinolone acetonide, dexamethasone sodium phosphate – by using their anti-inflammatory effects. According to DRRC Protocol I, the effect of intravitreal triamcinolone and laser was equivalent to that of ranibizumab (RBZ) and laser in a 24-week observation study; however, triamcinolone's effect started to decline because of cataract formation [12]. The study investigating fluocinolone inserts proved better effectiveness of the drug in patients with chronic DME than in non-chronic DME [13]. This may indicate that chronic DME is chemokine driven whereas non-chronic DME is VEGF driven. It suggests that anti-VEGF drugs may be a better treatment option for non-chronic DME and steroids should be used in chronic DME.

As was previously stated, intravitreal inserts of steroids lead to visual improvement in DME and PDR; however, they are a second-line treatment because of their side effects – intraocular pressure rises and cataract formation.

Laser therapy is applied mainly in patients with proliferative eye fundus changes. Multiple studies emphasize the importance of laser therapy in risk reduction of visual loss. According to Jiang *et al.*, panretinal photocoagulation (PRP) can inhibit neovascularization, improve macular edema and vision, and prevent deterioration of the disease [14]. However, laser therapy has limitations and potential complications such as vitreous hemorrhages and retinal cell destruction. Post-PRP destruction of retinal cells may result in permanent scotomas in the visual field, worse night vision and slow light-to-dark adaptation [15, 16].

Vitrectomy is a possible therapeutic choice in DR cases with retinal neovascularization and intravitreal hemorrhages. Multiple studies have assessed the efficiency of vitrectomy in prevention of visual loss. Nathan *et al.* proved that early vitrectomy performed in type 1 diabetes resulted in visual acuity of 10/20 or more in 36% of eyes, whereas

in 12% of eyes with no attempt of vitrectomy the visual acuity remained the same [17]. According to Brănișteanu *et al.* there is no significant difference in efficacy of retinal repair between the less invasive technique of 23G vitrectomy and 20G vitrectomy [18].

As glycemia is the major risk factor for developing retinopathy, control of blood glucose seems to be important in DR treatment and prevention. A study by Chew *et al.* revealed that glycemic control reduced the risk for DR progression by 33% [19]. However, it was proved that a positive effect of low blood glucose levels was observed mainly in early stages of DR, as moderately severe nonproliferative diabetic retinopathy has been defined as the level beyond which no further effect of intensified insulin therapy achieves any benefit over a 6-year period in type 1 diabetes [20].

Hypertension is a well-known risk factor for several chronic conditions such as DM. There have been several studies investigating a potential beneficial role of hypertension treatment in DR prevention. Estacio *et al.* [21] and Schrier *et al.* [22] revealed no difference between intensive and moderate blood pressure (BP) control with DR progression in diabetic patients. However, Do *et al.* in 2015 proved a benefit of more intensive blood pressure control intervention with respect to 4- to 5-year incidence of diabetic retinopathy [23]. Further studies conducted in 2020 suggested that tighter control of BP in participants with both hypertension and diabetes may be helpful in DR prevention [24].

Dyslipidemia is another potential modifiable risk factor of DR progression. Nielsen *et al.* proved that DM patients with statin therapy had 40% lower risk of DR development in comparison with DM patients with no dyslipidemia treatment [25], whereas other observational studies found no benefit of statins on diabetic retinopathy incidence [26]. However, some studies emphasize a role of another lipid-lowering agent, fenofibrate, in DR development and progression. Although the mechanisms of the positive fenofibrate effect are not entirely clear, FIELD and ACCORD trials proved that the drug delays DR progression [27].

Alternative drug therapies

Alternative drug therapy in DR consists of agents such as pancreatic kininogenase, antioxidants (calcium dobesilate (CaD), N-acetylcysteine (NAC), curcumin, resveratrol) or squalamine. According to the study by Lin *et al.* pancreatic kininogenase proved to be effective in NPDR treatment by improving microcirculation, anticoagulative and thrombolytic effects [28].

Calcium dobesilate with its antioxidant, antiapoptotic potential is an angioprotective agent that can be used to halt neovascularization and prevent DR progression. Anti-VEGF agents are a commonly used therapeutic option in DR treatment. Intravitreal injections of anti-VEGF by inhibiting vascular proliferation improve PDR patients' visual acuity and stop progression of the disease.

N-acetylcysteine is an antioxidant scavenging reactive oxygen species (ROS). Moreover, NAC inhibits the inflammatory process and angiogenesis by decreasing expression of pro-inflammatory and pro-angiogenic molecules – ICAM-1 and interleukin (IL)-8 – in activated endothelial and epithelial cells [29]. As diabetic retinopathy pathogenesis relies on both oxidative stress and angiogenesis, NAC revealed satisfactory effects in prevention of DR progression and became an alternative supplement of DR therapy [30].

Curcumin is a natural antioxidant affecting free radicals in multiple mechanisms. It inhibits angiogenesis by decreasing levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) and increasing the levels of the anti-oxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase [31]. By normalizing diabetic microvasculature- reducing vessel tortuosity, shrinkage and micro-aneurysms creation curcumin is a supplementary therapeutic agent in DR treatment [31].

Resveratrol is a natural polyphenol and antioxidant that can be found in the skin of red grapes and red wine. Bråkenhielm *et al.* [32] demonstrated the inhibition of neovascularization after orally administered treatment of resveratrol. It protects retinal epithelium cells from induced cell death; moreover it can reverse the apoptosis and oxidant production generated by benzo(e)pyrene, a toxic component of cigarette smoke [32]. Both antiangiogenic and antiapoptotic effects of resveratrol are used in cardiovascular diseases and diabetic retinopathy treatment.

Typically used squalamine – an inhibitor of multiple growth factors such as PDGF (platelet-derived growth factor) and b-FGF (basic fibroblast growth factor) – was proved to enhance post-anti-VEGF visual improvement in DR patients; squalamine efficacy in diabetic macular edema (DME) treatment is being assessed in clinical trials [33].

Emerging therapies

Gene therapy

Gene therapy is based on the expression of a specific transgene in order to minimize or cure a medical condition

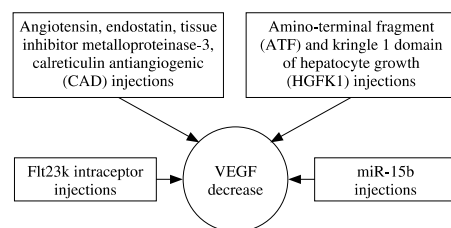


Fig. 1. Gene-specific targeting in retinal vasculopathy

with minimal possible side effects. Gene augmentation, gene-specific targeting and genome editing are commonly used methods of gene therapy [34].

In comparison to other organs, the eye is immune-privileged, so only a few inflammatory events are associated with the introduction of viral particles [35]. Moreover, the eye is a relatively small compartment, so it needs only low doses of a vector for gene delivery [35]. These factors enabled gene-specific targeting to become an alternative option in DR treatment.

There are two groups of genes that have been studied as potential objects for DR gene therapy – targeting retinal vasculopathy and targeting retinal protection.

Selecting the first group of genes aimed to decrease neovascularization and promote angiogenesis by interfering in the intraocular VEGF pathway. Flt23k is an anti-VEGF intraceptor that can interfere with the VEGF pathway and reduce VEGF secretion intracellularly [36]. There have been multiple studies based on animal models examining the efficacy of Flt23k injections in DR progression. Zhang *et al.* in 2015 proved that adeno-associated virus (AAV)-mediated injections of Flt23k inhibit murine choroidal neovascularization [37]. Several studies proved that AAV2 is the preferable vehicle as it is the focus in the regulation of VEGF signaling [35].

Gene therapy decreasing neovascularization involves microribonucleic acids (RNAs) (miRs). MiRs associated with VEGF were studied as a potential drug preventing PDR. Yang *et al.* found that miR-15b regulates the expression of VEGF by targeting the 3'-untranslated regions to inhibit their transcription [38]. The study proved that miR-15b expression has an influence on angiogenesis; however, Yang *et al.* used rats as a PDR animal model and further human based research is required.

Another way of targeting retinal vasculopathy is to use agents with antiangiogenic potential. AAV-mediated injections of pigment epithelium-derived factor (PEDF) succeeded in VEGF level decrease and DR progression [37]. Transduction of AAV-mediated endogenous agents such as angiotensin, endostatin, tissue inhibitor metalloproteinase-3 and calreticulin antiangiogenic domain (CAD) was found to inhibit retinal neovascularization in animal model-based research [12]. DR gene therapy includes inhibitors of cell proliferation such as amino-terminal fragment (ATF) and kringle 1 domain of hepatocyte growth (HGFK1); retinal transduction of the following molecules was found to reduce retinal neovascularization in mice models [39, 40] (Fig. 1).

AAV-mediated vectors inhibiting vasopermeability such as sFlt-1 and vasoinhibin were reported as potential DR gene treatments. Injections of these molecules resulted in reduction of blood-retinal barrier breakdown and enhanced some of the retinal functions [41, 42].

The second group of genes that became a target for DR comprises the genes responsible for retinal protection.

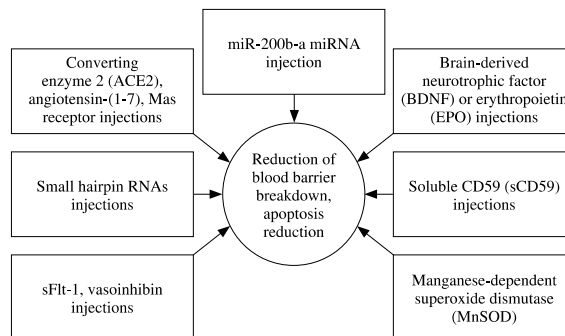


Fig. 2. Gene-specific targeting retinal protection

The treatment is based on affecting oxidative stress and apoptosis reduction and its indications are limited to initial stages of DR.

A significant increase of early growth response 1 (EGR1) expression in vascular cells has been observed in patients with high blood glucose levels. Ao *et al.* based on this observation used an AAV vector encoding small hairpin RNAs (a molecule silencing gene expression) directed against EGR1 which succeeded in retinal cell apoptosis reduction [43].

Hyperglycemia in diabetes suppresses autophagic activity in diabetes. Mao *et al.* arrested DR progression in rat models by enhancing the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3-II, a molecule responsible for autophagic activity detection [44].

There were successful trials based on using inhibitors of membrane attack complex to protect retinal neurons from apoptosis. A soluble CD59 (sCD59) – an inhibitor of membrane attack complex – reduced blood-retinal barrier breakdown and vascular leakage by 60% compared with the control group in a mouse model study by Adhi *et al.* [45]. Furthermore, soluble CD59 was proved to activate retinal glial cells, which are responsible for retinal ganglion cells' (RGCs) protection from apoptotic stimuli [45].

DR gene therapy targeting retinal protection uses injections of neurotrophic factors. Intravitreal admission of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) or erythropoietin (EPO) may induce positive neuroprotective effect by preventing blood-retinal barrier disruption and neuronal apoptosis [25]. Manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) delivery was also investigated as a potential way of DR gene therapy by decreasing oxidative stress [35].

The development of DR involves oxidative stress-related signaling pathways. MiR-200b, a miRNA, may regulate oxidative stress-related factor oxidation resistance 1 (Oxr1). Yu *et al.* in their research found that small nucleolar RNA host gene 4 (SNHG4) interacts with miR-200b and inhibits cell apoptosis in DR by upregulating Oxr1 [46].

The renin-angiotensin system (RAS) has been widely studied as a potential pathway for DR treatment. It was proved that RAS inhibitors may be useful in diabetic patients; however, RAS inhibitors currently in use cannot completely prevent the RAS neurodegenerative effect because of the presence of local angiotensin II [29]. Intravitreal injections of AAV-mediated angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), angiotensin-(1-7) and the Mas receptor decreased vascular leakage, inflammation and oxidative stress in diabetes-induced rodents [47] (Fig. 2).

Current studies are finding each year new possible pathways for gene therapy. However, there are multiple limitations of the treatment such as complexity of pathogenesis, safety of the vector delivery of the transgenes, and patient selection due to disease progression.

Mesenchymal stem cells

New DR therapy studies are focusing on the possible regenerative potential of retinal pigment epithelium (RPE). Many ocular diseases such as corneal limbal stem cell deficiency, age-related macular degeneration (AMD), glaucoma, and retinal dystrophies have been proved to be a target of stem cell therapies [48].

According to Gaddam *et al.* endothelial progenitor cell, embryonic stem cell and mesenchymal stem cell treatment could be a viable option as a prevention of retinal neovascularization and promotion of retinal regeneration in DR [49]. Mesenchymal stem cells (MSC) are found in a variety of different tissues and they have multi-differentiative potential. Due to the simple procedure of isolation and propagation mesenchymal cells derived from bone marrow (BMSCs) are the most commonly used MSCs [50]. BMSCs' repair potential is based on the ability to express basic fibroblast growth factor (bFGF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF).

According to the Huang *et al.* study endothelial progenitor cells, mesenchymal stem cells and hematopoietic

stem cells induce endothelial cell damage repair and halt new pathological retinal vessel formation [50]. The authors did not include adult stem cells and induced pluripotent stem cells in their investigation process, which could be verified in further trials in the future.

In the Huang *et al.* research streptozotocin (STZ)-induced rats were intravitreally injected with BMSCs and CNTF, to study whether the combination of two agents can enhance the viability of transplanted BMSCs [50]. The research emphasizes the dominant role of CNTF by comparison of BMSC differentiative potential with or without inductive factors pretreatment. Previously CNTF was proved to prolong the perseverance of RPE cells by JAK/STAT3 signaling pathway activation. Huang *et al.* revealed that CNTF admission alone could influence retinal regeneration by inducing the expression of rhodopsin – both on post-injection days 14 and 21 [50]. The study revealed that CNTF supplement can promote BMSCs' cytokine secretion and therefore accelerate RPE cell regeneration [50]. Moreover, it was proved that CNTF promote BMSCs' differentiation into RPE cells – crucial cells in retinal damage repair. The research did not study whether multiple injections could enhance the possible treatment effect, or whether there is a correlation between concentration of CNTF and the final effect. These missing aspects merit further investigation in the future.

SGLT2 inhibitors

Sodium-dependent glucose transporter 2 (SGLT2) inhibitor is a new antidiabetic drug, included in the family of sodium-glucose transporters. It controls hyperglycemia, hypertension and hyperlipidemia; therefore it is mainly dedicated to diabetic patients at risk of developing chronic heart failure. Recent studies have revealed that SGLT2 is found not only in the proximal convoluted tubules S1 and S2 in kidneys but also in the lens and the retina [51].

SGLT2 plays the role of a retinal glucose sensor; Na⁺-dependent glucose cellular concentration causes pericytes swelling, destruction and increased retinal vascular leakage [52]. By preventing pericyte swelling SGLT2 inhibitor postpones vascular changes and could be a successful treatment choice in an early stage of DR.

Vascular diameter changes play a significant role in development and progression of DR. Multiple studies have proved that wall to lumen ratio (WLR) and cross-sectional area of arteriolar wall growth correlate with the onset and the severity of DR [53]. Green *et al.* studied dapagliflozin influence on the retinal microvasculature and found no increase in the retinal wall-cavity ratio after the treatment [54]. Moreover, the study emphasized dapagliflozin's role in the retinal capillary flow decrease and vascular hyperemia prevention.

Several studies revealed a possible connection between SGLT2 expression and the sympathetic nervous system (SNS), as early autonomic disorders have been found in

DR patients. SNS activation, which is indicated by norepinephrine occurrence, increases kidneys' SGLT2 expression and correlates with nerve damage in the outer layer of the retina [54]. However, these interactions should be investigated thoroughly in further clinical studies.

Although SGLT2 has wide therapeutic potential in general diabetic treatment, its efficacy as a DR drug has been evaluated only in animal model-based studies and should be examined in future research.

Islet cell transplantation

Islet cell transplantation (ICT) has been commonly used in diabetes treatment since the early 1990s. Extensive research has tried to examine the effectiveness of pancreas transplantation in DR therapy, supporting the stability of retinal changes after the procedure [55]. Thompson *et al.* conducted a prospective, crossover, cohort study comparing medical treatment and islet cell transplantation efficacy in DR progression prevention in a 3-year follow-up. The 44 patients were 20 to 65 years of age, with a history of more than 5 years of diabetes duration; they underwent multiple eye fundus examination with possible macular edema evaluation [56]. Progression was defined as a need for laser treatment or one step worsening along the international disease severity scale [56].

The results revealed significant discrepancies in both groups. Posttransplant patients had better hyperglycemia control and progression was observed more often in the medical group than in ICT subjects (12.2% vs. 0%) [56]. Possibly the better effect of IST may be due to the increase of retinal blood flow after the therapy [57]. There was a significant difference between the two groups in post-ICT immunosuppression, which did not have any previously documented effect on DR progression.

Although Thompson *et al.* found that DR progression is less probable in post-ICT patients than after intensive medical therapy usage, their study was not randomized and the determination of endpoints was not masked, which should be changed in the future.

Conclusions

Traditional therapies including drugs controlling hyperglycemia, laser therapy, vitrectomy, and intravitreal injections of anti-VEGF are widely applied in DR patients with satisfactory therapeutic effects. Although these treatments are effective in retinal neovascularization or retinal macular edema prevention, they have some limitations in clinical application. New therapies are bringing new mechanisms such as gene control, enhancement of regenerative potential of retinal pigment epithelium focusing on the minimal possible side effects. Recent treatments were proved to be successful in pathological neovascularization prevention; however, most of the therapeutic studies remained at the basic research stage or were conducted on

animal models. Hopefully, more randomized, human based studies will be carried out in the future with high-quality positive clinical therapeutic evidence.

The authors declare no conflict of interest.

References

- Wen S, Wang C, Gong M, Zhou L (2019): An overview of energy and metabolic regulation. *Sci China Life Sci* 62: 771-790.
- Chai WF, Tang KS (2021): Protective potential of cerium oxide nanoparticles in diabetes mellitus. *J Trace Elem Med Biol* 66: 1-11.
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. (2019): Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* 157: 1-10.
- Liu X, Wu N (2015): Progress of nanotechnology in diabetic retinopathy treatment. *Int J Nanomedicine* 16: 1391-1401.
- Semeraro F, Cancarini A, dell'Omo R, et al. (2015): Diabetic retinopathy: vascular and inflammatory disease. *J Diabetes Res* 2015: 1-13.
- Scanlon PR, Aldington SJ, Stratton IM (2013): Epidemiological issues in diabetic retinopathy. *Middle East Afr J Ophthalmol* 20: 293-300.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, et al. (1984): The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* 102: 520-526.
- Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, et al. (2001): UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia* 44: 156-163.
- Gross JG, Glassman AR, Jampol LM, et al. (2015): Panretinal photocoagulation vs intravitreal ranibizumab for proliferative diabetic retinopathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 314: 2137-2146.
- Virgili G, Parravano M, Evans JR, et al. (2018): Anti-vascular endothelial growth factor for diabetic macular oedema: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev* 10: 1-4.
- Iglicki M, González DP, Loewenstein A, Zur D (2021): Next-generation anti-VEGF agents for diabetic macular oedema. *Eye (Lond)*; <https://doi.org/10.1038/s41433-021-01722-8>.
- Elman MJ, Aiello LP, Beck RW, et al. (2010): Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 117: 1064-1077.
- Cunha-Vaz J, Ashton P, Iezzi R, et al. (2014): Sustained delivery fluocinolone acetonide vitreous implants: long-term benefit in patients with chronic diabetic macular edema. *Ophthalmology* 121: 1892-1903.
- Jiang Y (2020): Effect of total retinal laser photocoagulation on diabetic retinopathy. *Medical Equip* 21: 1002-2376.
- Rohrschneider K, Bultmann S, Gluck R, et al. (2000): Scanning laser ophthalmoscope fundus perimetry before and after laser photocoagulation for clinically significant diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 129: 27-32.
- Russell PW, Sekuler R, Fetkenhour C (1985): Visual function after pan-retinal photocoagulation: a survey. *Diabetes Care* 8: 57-63.
- Nathan DM, Genuth S, Lachin J, et al. (1993): The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986.
- Brănișteanu DC, Bilha A, Moraru A (2016): Vitrectomy surgery of diabetic retinopathy complications. *Rom J Ophthalmol* 60: 31-36.
- Chew E, Ambrosius W, Davis M, et al. (2011): Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 363: 233-244.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1998): Early worsening of diabetic retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Arch Ophthalmol* 116: 874-886.
- Estacio RO, Jeffers BW, Gifford N, Schrier RW (2000): Effect of blood pressure control on diabetic microvascular complications in patients with hypertension and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23: B54-64.
- Schrier RW, Estacio RO, Jeffers B (1996): Appropriate blood pressure control in NIDDM (ABCD) trial. *Diabetologia* 39: 1646-1654.
- Do DV, Wang X, Vedula SS, et al. (2015): Blood pressure control for diabetic retinopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 1: 278-279.
- Liu L, Quang ND, Banu R, et al. (2020): Hypertension, blood pressure control and diabetic retinopathy in a large population-based study. *PLoS One* 15: 1-15.
- Nielsen SF, Nordestgaard BG (2014): Statin use before diabetes diagnosis and risk of microvascular disease: a nationwide nested matched study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2: 894-900.
- Klein BE, Myers CE, Howard KP, Klein R (2015): Serum lipids and proliferative diabetic retinopathy and macular edema in persons with long-term type 1 diabetes mellitus: the Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *JAMA Ophthalmol* 133: 503-510.
- Ioannidou E, Tseriotis VS, Tziomalos K (2007): Role of lipid-lowering agents in the management of diabetic retinopathy. *World J Diabetes* 8: 1-6.
- Lin WX, Zang J, Bao JL, et al. (2011): Compound Xueshuantong Capsule and Pancreatic Kikopeptidase in treatment of NPDR. *Int J Ophthalmol* 11: 66-68.
- Radomska-Leśniewska D, Balan BJ, Skopiński P (2017): Angiogenesis modulation by exogenous antioxidants. *Cent Eur J Immunol* 42: 370-376.
- Radomska-Leśniewska D, Skopiński P (2012): N-acetylcysteine as an anti-oxidant and anti-inflammatory drug and its some clinical applications. *Cent Eur J Immunology* 37: 57-66.
- Radomska-Leśniewska D, Osiecka-Iwan A, Hyc A, et al. (2019): Therapeutic potential of curcumin in eye diseases. *Cent Eur J Immunol* 44: 181-189.
- Bräkenhielm E, Cao R, Cao Y (2001): Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *FASEB J* 15: 1798-1800.
- Radomska-Leśniewska D, Skopinski P, Balan BJ, et al. (2015): Review paper Angiomodulatory properties of Rhodiola spp. and other natural antioxidants. *Cent Eur J Immunol* 40: 249-262.
- Das A, McGuire P, Minickaraj F (2016): Novel pharmacotherapies in diabetic retinopathy: Current status and what's in the horizon? *Indian J Ophthalmol* 64: 4-13.
- Whitehead M, Wickremasinghe S, Osborne A, et al. (2018): Diabetic retinopathy: a complex pathophysiology requiring

- novel therapeutic strategies. *Expert Opin Biol Ther* 18: 1257-1270.
36. Wang JH, Roberts GE, Liu GS (2020): Updates on gene therapy for diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 20: 1-12.
37. Zhang X, Das SK, Passi SF, et al. (2015): AAV2 delivery of Flt23k intraceptors inhibits murine choroidal neovascularization. *Mol Ther* 23: 226-234.
38. Yang Y, Liu Y, Li Y, et al. (2020): MicroRNA-15b targets VEGF and inhibits angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy 105: 3404-3415.
39. Xin L, Xu R, Zhang Q, et al. (2000): Kringle 1 of human hepatocyte growth factor inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation stimulated by basic fibroblast growth factor and causes cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 186-190.
40. Kim KS, Hong YK, Lee Y, et al. (2003): Differential inhibition of endothelial cell proliferation and migration by urokinase subdomains: amino-terminal fragment and kringle domain. *Exp Mol Med* 35: 578-585.
41. Ramirez M, Wu Z, Moreno-Carranza B, et al. (2011): Vaso-inhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 8944-8950.
42. Diaz-Lezama N, Wu Z, Adan-Castro E, et al. (2016): Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vaso-inhibin and soluble VEGF receptor 1. *Lab Investig* 96: 283-295.
43. Ao H, Liu B, Li H, Lu L (2019): Egr1 mediates retinal vascular dysfunction in diabetes mellitus via promoting p53 transcription. *J Cell Mol Med* 20: 3345-3356.
44. Mao XB, Cheng YH, Xu YY (2019): MiR-204-5p promotes diabetic retinopathy development via downregulation of microtubule-associated protein 1 light chain 3. *Exp Ther Med* 17: 2945-2952.
45. Adhi M, Cashman SM, Kumar-Singh R (2013): Adeno-associated virus mediated delivery of a non-membrane targeted human soluble CD59 attenuates some aspects of diabetic retinopathy in mice. *PLoS One* 8: 1-12.
46. Yu J, Qin M, Li J, Cui S (2021): LncRNA SNHG4 sponges miR-200b to inhibit cell apoptosis in diabetic retinopathy. *Arch Physiol Biochem* 6: 1-6.
47. Verma A, Shan Z, Lei B, et al. (2012): ACE2 and Ang-(1-7) confer protection against development of diabetic retinopathy. *Mol Ther* 20: 28-36.
48. Dąbrowska AM, Skopiński P (2017): Stem cells in regenerative medicine – from laboratory to clinical application – the eye. *Cent Eur J Immunol* 42: 173-180.
49. Gaddam S, Periasamy R, Gangaraju R (2019): Adult stem cell therapeutics in diabetic retinopathy. *Int J Mol Sci* 20: 1-11.
50. Huang Q, Ding Y, Yu J, et al. (2021): Induction of differentiation of mesenchymal stem cells into retinal pigment epithelial cells for retinal regeneration by using ciliary neurotrophic factor in diabetic rats. *Curr Med Sci* 41: 145-152.
51. Li XJ, Li CY, Bai D, Leng Y (2021): Insights into stem cell therapy for diabetic retinopathy: a bibliometric and visual analysis. *Neural Regen Res* 16: 172-178.
52. Yakovleva T, Sokolov V, Chu L, et al. (2019): Comparison of the urinary glucose excretion contributions of SGLT2 and SGLT1: a quantitative systems pharmacology analysis in healthy individuals and patients with type 2 diabetes treated with SGLT2 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* 21: 2684-2693.
53. Sha W, Wen S, Chen L, et al. (2020): The role of SGLT2 inhibitor on the treatment of diabetic retinopathy. *J Diabetes Res* 2020: 1-6.
54. Green J, Yurdagul J, McInnis MC, et al. (2014): Flow patterns regulate hyperglycemia-induced subendothelial matrix remodeling during early atherogenesis. *Atherosclerosis* 232: 277-284.
55. Giannarelli R, Coppelli A, Sartini M, et al. (2005): Effects of pancreas-kidney transplantation on diabetic retinopathy. *Transpl Int* 18: 619-622.
56. Thompson DM, Begg IS, Harris C, et al. (2008): Reduced progression of diabetic retinopathy after islet cell transplantation compared with intensive medical therapy. *Transplantation* 85: 1400-1405.
57. Venturini M, Fiorina P, Maffi P, et al. (2006): Early increase of retinal arterial and venous blood flow velocities at color doppler imaging in brittle type 1 diabetes after islet transplant alone. *Transplantation* 81: 1274-1277.

Omówienie:

Terapia genowa znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny z coraz większym powodzeniem. Geny wykorzystywane w terapii retinopatii cukrzycowej mają dwa cele- hamować neowaskularyzację za pośrednictwem szlaku VEGF oraz działać protekcyjnie wobec siatkówki przez zmniejszenie stresu oksydacyjnego i redukcję apoptozy komórek.

Terapia genowa, hamująca neowaskularyzację, wykorzystuje intrareceptor anti-VEGF-Flt23k, kwasy mikrorybonukleotydowe (mi-RNA), cząsteczki mediowane wirusami zależnymi od adenowirusów (ang. *Adeno-associated viruses*-AAV) zawierające czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (ang. *Pigment epithelium derived factor*- PEDF) oraz wiele innych [68, 69]. Protekcję siatkówkową zapewniają doszkliskowe iniekcje AAV- mediowanym inhibitorem konwertazy angiotensyny 2 (ang. *Angiotensin-converting enzyme 2*- ACE2), angiotensyną 1-7, MAS receptorem, a także doszkliskowe podanie neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. *Brain-derived neurotrophic factor*- BDNF) czy erytropoetyny. [70,71].

Kolejna alternatywna terapia retinopatii cukrzycowej bazuje na wykorzystaniu potencjalnej regeneracji komórek nabłonka barwnikowego siatkówki z zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych. Dotychczasowe badania na szczurach wykazały, iż pochodzące ze szpiku kostnego komórki macierzyste (ang. *Bone marrow mesenchymal stromal cells*- BMSCs) przyspieszają regenerację RPE [72].

Zahamowanie progresji retinopatii cukrzycowej zaobserwowano po zastosowaniu inhibitorów SGLT2 oraz po przeszczepie wysepek trzustkowych. Jednak analizę skuteczności tych terapii oparto na badaniach nierandomizowanych lub z wykorzystaniem zwierząt, dlatego wymagają one dalszej weryfikacji w przyszłości [73,54].

3. Dyskusja

Zgodnie z definicją WHO, cukrzyca to grupa chorób metabolicznych, charakteryzująca się hiperglikemią z powodu niedoboru lub nieprawidłowej sekrecji insuliny. Przewlekłe podwyższony poziom glukozy we krwi nieodwracalnie zaburza strukturę i funkcje organów, takich jak oczy, nerki, serce, układ nerwowy czy układ naczyniowy [74].

Nieprawidłowa masa ciała, siedzący tryb życia, ograniczona aktywność fizyczna przyczyniają się do coraz większego rozpowszechnienia rozpoznania choroby i konieczności leczenia jej wieloorganowych konsekwencji.

Retinopatia cukrzycowa jest powikłaniem, wynikającym ze zmian na poziomie mikronaczyniowym. Rozwój choroby następuje powoli i bezobjawowo- nawet w zaawansowanych stadiach pacjent może nie zauważyć pogorszenia ostrości wzroku. Niemniej jednak, DR dotyczy nawet 1/3 pacjentów z cukrzycą, doprowadzając do utraty widzenia u 80 % z nich [75,76]. Szacuje się, iż po około 30 latach trwania choroby aż u 90 % chorych stwierdza się liczne zmiany na dnie oka, w tym cukrzycowy obrzęk plamki [77]. Dlatego screening bezobjawowych chorych jest niezbędny w prewencji rozwoju nieodwracalnych zmian w narządzie wzroku.

Patofizjologia retinopatii cukrzycowej jest procesem złożonym. Zmiany na poziomie siatkówki dotyczą zarówno mikrowaskulatury, jak i komórek nerwowych [78,79]. Procesy neurodegeneracyjne i waskulopatia są warunkowane przez liczne szlaki powiązane z aktywnością PKC, VEGF czy leukostazę, których wspólnym mianownikiem jest stres oksydacyjny. Wyżej wymienione mechanizmy mają wspólne substraty, enzymy i często działają na zasadzie sprzężenia zwrotnego.

Zmiany mikronaczyniowe siatkówki rozpoczynają się od patologii w obrębie błony podstawnej (ang. *Basement membrane*- BM). W wyniku zwiększonej syntezy kolagenu IV, fibronektyny, lamininy dochodzi do pogrubienia BM, a w konsekwencji do zaniku perycytów [80].

Od lat badana jest kolejność wystąpienia zmian mikronaczyniowych i procesów neurodegeneracyjnych. Według wielu autorów chronologia tych mechanizmów nie jest spójna [81]. Zmiany neurodegeneracyjne dotyczą zarówno tkanki nerwowej, jak i glejowej. Dochodzi do apoptozy komórek nerwowych, aktywacji mikrogleju, co skutkuje zmniejszeniem grubości warstwy włókien nerwowych, komórek zwojowych i warstwy spłotowanej wewnętrznej [82]. Funkcjonalne zaburzenia siatkówkowe w przebiegu DR można zaobserwować w całopolowym bądź wielogniskowym badaniu elektretinografii (ang. *Electroretinography*- ERG).

Naukowcy podkreślają podobne pochodzenie etiologiczne siatkówki i kory mózgowej, sugerując powiązanie zaburzeń funkcji wzrokowych (obniżenia czucia kontrastu, zaburzenia widzenia barw i gorszego widzenia w ciemności) z pogorszeniem procesów neurokognitywnych w przebiegu cukrzycy [83].

Znajomość procesów uszkodzenia fotoreceptorów i naczyń siatkówki jest cenną wiedzą, niezbędną zarówno do tworzenia nowych narzędzi diagnostycznych, jak i nowoczesnych schematów terapeutycznych.

Standardem rozpoznania i monitorowania retinopatii cukrzycowej jest badanie dna oka (przy pomocy oftalmoskopii pośredniej lub bezpośredniej), angiografia fluoresceinowa oraz optyczna koherentna tomografia.

Do niedawna proces diagnostyczny pacjenta z podejrzeniem retinopatii cukrzycowej każdorazowo zaczynał się od wykonania angiografii fluoresceinowej. FA jest badaniem obrazującym mikrotętniaki, wysięki twarde, ogniska waty, anomalnie

naczyniowe, obszary przecieku i hipoperfuzji, a także pozwala określić postać cukrzycowego obrzęku plamki (ogniskowy, rozlany, niedokrwienny DME).

Ze względu na konieczność podania kontrastu, FA nie jest wskazana w przypadkach takich jak: ciąża (1 trymestr) i karmienia piersią, odczyn alergiczny po fluoresceinie w wywiadzie, ciężka niewydolność nerek czy stan po świeżym zawale lub udarze. Inwazyjność angiografii ogranicza zastosowanie badania w monitorowaniu przebiegu DR.

Według wytycznych EURETINY ze względu na możliwość częstego powtarzania testu, najlepszym narzędziem diagnostycznym do oceny morfologii siatkówki jest OCT (w tym z opcją uwidaczniającą naczynia, czyli angio-OCT) [84]. OCT charakteryzuje się łatwym i szybkim wykonaniem, jest badaniem nieinwazyjnym i powtarzalnym. W przebiegu makulopatii cukrzycowej badanie optycznej koherentnej tomografii pozwala ocenić centralną grubość siatkówki (ang. *Central retinal thickness- CRT*), zobrazować przestrzenie płynowe śród- i/lub podsiatkówkowe oraz patologiczne struktury, takie jak kłębki waty, wysięki twarde czy mikrotętniaki. Monitorowanie zmienności wartości CRT jest ważnym elementem oceny skuteczności terapii DME. Wzrost grubości siatkówki oznacza zwiększenie obrzęku i niepowodzenie leczenia, jednak mniejsze CRT może być konsekwencją nie tylko efektywności zastosowanych leków, ale także obecności niedokrwiennych postaci DME [85].

Angiografia optycznej koherentnej tomografii- OCTA- jest innowacyjną, bezkontrastową metodą obrazowania przepływu krwi w naczyniach siatkówki oraz choriokapilarach. W przeciwieństwie do angiografii fluoresceinowej i indocyjaninowej (ang. *Indocyanine green angiography- ICGA*) OCTA jest badaniem nieinwazyjnym i statycznym. Obraz angio-OCT jest stały w czasie, w przeciwieństwie do FA i ICGA, w których wizualizacja naczyń zmienia się w kolejnych minutach badania, w zależności od przepływu barwnika [86].

W trakcie badania OCTA tworzony jest skan splotów naczyniowych siatkówki- powierzchniowego (ang. *Superficial capillary plexus-SCP*), głębokiego (ang. *Deep capillary plexus-DCP*) oraz choriokapilar i naczyń siatkówki. W porównaniu do tradycyjnej angiografii angio-OCT w dokładniejszy sposób ocenia łożysko naczyniowe i obszary awaskularne, ale ogranicza się do oceny strefy okołoplamkowej z pominięciem obwodu siatkówki.

OCTA pozwala na wykrycie zaburzeń mikrokrążenia na bardzo wczesnym etapie retinopatii cukrzycowej. Przewaga angio-OCT nad FA w diagnostyce DR polega na obrazowaniu patologii mikronaczyniowych nie tylko na poziomie splotu powierzchniowego, ale także głębokiego [87]. Zmiany w DCP są jednymi z pierwszych obserwowanych w rozwoju mikroangiopatii cukrzycowej, co więcej, według licznych prac, stanowią one ważny czynnik predykcyjny co do długoterminowej ostrości wzroku pacjenta [88].

Oprócz nieprawidłowości naczyniowych (mikrotętniaków, pętli naczyniowych itp.), OCTA służy do oceny zlewających się ze sobą obszarów niedokrwienia. Ubytki naczyniowe doprowadzają do poszerzenia dołkowej strefy beznaczyniowej (FAZ), której powierzchnia istotnie zwiększa się w przebiegu DR w porównaniu ze zdrowymi osobami [89,90].

Ze względu na brak dynamicznego charakteru i ograniczenie przestrzenne badania, które cechują angio-OCT, OCTA jest jedynie uzupełniającym narzędziem w trakcie rozpoznania DR. Zgodnie z wytycznymi EURETINY angio-OCT, jako badanie szybkie i nieinwazyjne, jest rekomendowane w monitorowaniu stopnia uszkodzenia struktur naczyniowych siatkówki i naczyńówki [84].

Nowoczesnym narzędziem, służącym do oceny mikrowaskulatury i zmian na poziomie komórek nerwowych siatkówki, jest technologia optyki adaptatywnej. Urządzenia wykorzystujące AO pozwalają na detekcję wczesnych patologii, niemożliwych do uchwycenia przy pomocy żadnego innego badania.

Technologia AO została wynaleziona w roku 1953, znajdując zastosowanie w latach 70-tych w przemyśle militarnym [91]. Pod koniec XX wieku po raz pierwszy skorzystano z optyki adaptatywnej, aby *in vivo* zobrazować ludzką siatkówkę.

Aparat rtx1TM (Imagine Eyes, Orsay, France) wykorzystując obrazowanie przepływu świetlnego, sprzęga czujnik czoła fali i odkształcone lustro z funduskamerą o dużym powiększeniu [92]. W porównaniu do innych urządzeń, posługujących się technologią AO, rtx1TM charakteryzuje się bardzo szybką akwizycją pojedynczego zdjęcia z zachowaniem wysokiej rozdzielczości obrazu.

Aparat pozwala na wczesną detekcję zmian typowych dla retinopatii cukrzycowej, uwidaczniając struktury, takie jak mikroaneuryzmaty, mikrokrwotoczki, wysięki twade, cysty wewnątrzsiatkówkowe czy ściany naczyń tętniczych [93-95].

Rozdzielczość lateralna rtx1TM wynosi 1.6 mikronów dla 850 nm długości fali, co umożliwia obrazowanie mikrostruktur siatkówki, takich jak pojedyncze receptory wzrokowe czy komórki krwi. Układy fotoreceptorów są przedstawiane w postaci mozaik heksagonów. Aparat rtx1TM posługuje się domeną Voronoi celem oceny sąsiedztwa receptorów wzrokowych.

Podstawą analizy fotoreceptorów z użyciem technologii AO jest kalkulacja średniej gęstości czopków. Domena Voronoi, ograniczając niedoszacowanie wartości, wynikających z nakładania się obrazów, pozwala policzyć gęstość receptorów nerwowych w systemie metrycznym (czopki/ mm²) lub kątowym (czopki/stopnie) [40]. Ważnym elementem, warunkującym prawidłową kalkulację parametrów fotoreceptorów, jest długość gałki ocznej. W przypadku długiej gałki ocznej powierzchnia analizowanej siatkówki ulega zwiększeniu, a zatem gęstość czopków w systemie metrycznym zmniejsza się [96].

Rozmieszczenie czopków (ang. *Cone spacing*) to dodatkowy parametr powstały w analizie urządzenia rtx1TM. Charakterystyka rozmieszczenia bazuje na ocenie najbliższych komórek dla konkretnego receptora, a wartość czynnika ulega zwiększeniu w przypadku pojedynczych fotoreceptorów [97]. Analiza czopków przy użyciu rtx1TM udowodniła, że prawidłowa gęstość może współistnieć z wysokimi wartościami rozmieszczenia fotoreceptorów. Dlatego ważna jest szerokospektralna ocena komórek obejmująca obydwa parametry, a także dodatkowe aspekty takie jak ich regularność.

Aparat rtx1TM posługując się metodologią diagramów Voronoi, tworzy mozaiki fotoreceptorów, przypominające układy małych kafelków. Kafelki to poligony, a im większy procent z nich ma kształt heksagonalny, tym mniejsze odchylenie od normy. Według wcześniejszych publikacji [98] w obszarze okołodołkowym czopki heksagonalne stanowią więcej niż 70 % wszystkich, a wartość 50 % i mniej sugeruje istotne zaburzenie morfologii siatkówki.

Technologia AO jest nieinwazyjną metodą obrazowania mikrowaskulatury siatkówki. Kamera rtx1TM pozwala na dokładną i powtarzalną ocenę naczyń o średnicy

od 70 do 150 μm . Dotychczas analiza mikrounaczynienia siatkówki wymagała mikromiografii materiałów pobranych w trakcie biopsji [99].

Parametry naczyniowe mierzone za pomocą aparatu rtx1TM to [40]:

- grubość ściany naczynia (ang. *Wall thickness*-WT)
- wymiar światła naczynia (ang. *Lumen diameter*-LD)
- wymiar naczynia (ang. *Vessel diameter*-VD), czyli suma WT oraz LD
- współczynnik WLR, czyli stosunku grubości ściany naczynia do jego światła

współczynnik powierzchni przekroju ściany naczynia (ang. *The cross-sectional area of the vascular wall*- WCSA), wyliczany automatycznie na podstawie wartości VD i LD. Technologia AO jest ważnym narzędziem diagnostycznym w mikroangiopatii cukrzycowej. W toku trwania choroby obserwowany jest remodelling ścian naczyń. Zwiększa się grubość błony środkowej, co doprowadza do wzrostu WT oraz zmniejszenia LD. Dochodzi do hipertrofii i hiperplazji komórek mięśniowych, skutkujących wzrostem współczynników WLR oraz WCSA [100-102].

Celem pracy doktorskiej była obserwacja zmian morfologii siatkówki, zachodzących w toku trwania cukrzycy. Wykonano dwa badania wykorzystujące technologię AO. Pierwsze z nich polegało na ocenie parametrów naczyniowych, fotoreceptorowych w grupie pacjentów z podwyższonym wskaźnikiem BMI, czyli osób ze zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycy typu II. Drugie badanie stanowiła 2-letnia obserwacja zmian mikrostruktury komórek receptorowych siatkówki i naczyń w toku trwania cukrzycy (typu I i II). W 2-letniej analizie posłużono się obrazami z aparatu rtx1TM oraz kilkakrotnie powtarzanymi skanami OCT obszaru okołoplamkowego.

Dotychczas wielokrotnie badano mikrostrukturę siatkówki dorosłych osób. Prace te wykazały, że parametry czopków mogą istotnie różnić się pomiędzy zdrowymi osobnikami, pomimo braku istniejących patologii siatkówkowych [103]. Badania przeprowadzone w toku przewodu doktorskiego nie wykazały istotnych statystycznie dysproporcji w charakterystyce fotoreceptorów między poszczególnymi kwadrantami siatkówki. Niemniej jednak, wykazano największą gęstość czopków w części skroniowej obszaru okołoplamkowego. Wnioski te były zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [53,54,104].

Otyłość i nadwaga zwiększają ryzyko rozwoju zaburzeń metabolicznych (stanu przedcukrzycowego, cukrzycy), chorób sercowo-naczyniowych, nowotworów oraz przedwczesnej śmierci. W wielu badaniach udowodniono dodatnią korelację między podwyższoną masą ciała i wymienionymi schorzeniami [105,106,107].

W toku przewodu doktorskiego wykazano istotny wpływ podwyższonego BMI na zwiększenie grubości ścian naczyń. Tym samym udowodniono, iż wzrost masy ciała koreluje z nieprawidłowo wysokim współczynnikiem WLR i WCSA. Do podobnych wniosków doszli autorzy licznych, wcześniejszych prac, dowodząc istnienie wpływu otyłości na wzrost grubości warstwy środkowej i wewnętrznej tętnic (wskaźnik IMT) [41, 45,108]. W opozycji do wyżej wymienionych badań, duża prospektywna analiza, przeprowadzona w Wisconsin, nie wykazała pozytywnej zależności między podwyższoną masą ciała a zwężeniem światła drobnych naczyń tętnicznych [109].

Analiza, przeprowadzona w toku przewodu doktorskiego, udowodniła niekorzystny wpływ wysokiego wskaźnika BMI na stan tętniczek siatkówki. Spójne wyniki zaprezentowała Zaleska i inni w 2017 roku, opisując istotną zależność zaburzeń mikrokrążenia z nieprawidłowym poziomem lipidów i wysokim BMI w grupie pacjentów z rozpoznany stanem przedcukrzycowym [21].

W toku przewodu doktorskiego badano zmiany zachodzące w morfologii siatkówki w czasie trwania cukrzycy. Liczne dotychczasowe prace [21, 40, 49, 51, 56, 95, 110] posługiwały się technologią AO celem oceny parametrów fotoreceptorowych w retinopatii cukrzycowej, ale żadna z nich nie prezentowała wyników długoletniej obserwacji. Wnioski w wyżej wymienionych publikacjach były spójne- potwierdziły istotnie niższą gęstość i zaburzone przestrzenne rozmieszczenie czopków w grupie pacjentów cukrzycowych w porównaniu ze zdrową populacją. Tan i inni zaprezentowali odmienne wyniki [111]. Niemniej jednak, brak różnicy w morfologii i gęstości czopków danej grupy badanej względem zdrowych osób mógł wynikać z krótkiego czasu trwania cukrzycy typu 1.

Obserwacja, przeprowadzona w trakcie przewodu doktorskiego, wykazała istotnie niższą gęstość i wyższy współczynnik rozmieszczenia czopków w grupie pacjentów z cukrzycą w porównaniu do zdrowych osobników, zarówno na początku badania, jak i po upływie 2 lat. Nikt dotąd nie obserwował zmian zachodzących w czasie trwania choroby przy pomocy technologii AO. Wyniki pracy doktorskiej można odnieść jedynie do dwóch innych publikacji, w których udowodniono, że czas trwania cukrzycy nie ma wpływu na gęstość czopków [49,56].

Liczne prace wykazały zwiększoną grubość ścian naczyń, zmniejszony wymiar światła naczynia-WT, a zatem zwiększony współczynnik WLR i WCSA w grupie pacjentów cukrzycowych bądź z rozpoznanym stanem przedcukrzycowym [14, 21, 58, 112, 113,114]. Wyniki prezentowane w pracy doktorskiej są spójne z wcześniejszymi doniesieniami. Ponadto w 2-letniej obserwacji udowodniono znamienne pogorszenie parametrów mikronaczyniowych w toku trwania cukrzycy. Podobne wnioski zaprezentowano w pracy Matuszewskiego i innych [114], gdzie wyższe wartości WT, WLR i WCSA w grupie pacjentów z DM1 korelowały z dłuższym czasem trwania choroby.

Zbiór publikacji pracy doktorskiej ma na celu podkreślić rolę technologii optyki adaptatywnej jako narzędzia diagnostycznego w chorobach metabolicznych. Badania z zastosowaniem kamery rtx1TM udowodniły ogromny potencjał urządzenia w detekcji wczesnych zaburzeń mikrostruktury siatkówki w przebiegu otyłości, stanu przedcukrzycowego czy początkowych stadiach retinopatii cukrzycowej. Optyka adaptacyjna jest obiecującym narzędziem zarówno do wczesnej diagnostyki, analizy patofizjologii, jak i przyszłych odkryć terapeutycznych chorób metabolicznych.

4. Bibliografia

1. American Diabetes Association; 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes—2021, Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes- 2021*. Diabetes Care, 2021. 44: 15-33
2. Majkowska, L., *Definicja i klasyfikacja cukrzycy*. Podstawy diabetologii: dla studentów medycyny i lekarzy praktyków, 2016, Wydawnictwo Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego: 7-17
3. Chai, W.F., Tang, K.S., *Protective potential of cerium oxide nanoparticles in diabetes mellitus*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2021. 66: 1-11
4. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., Williams, R., & IDF Diabetes Atlas Committee (2019). *Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition*. Diabetes research and clinical practice. 157
5. Teo, Z. L., Tham, Y. C., Yu, M., Chee, M. L., Rim, T. H., Cheung, N., Bikbov, M. M., Wang, Y. X., Tang, Y., Lu, Y., Wong, I. Y., Ting, D. S. W., Tan, G. S. W., Jonas, J. B., Sabanayagam, C., Wong, T. Y., & Cheng, C. Y., *Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis*. Ophthalmology, 2021. 128(11): 1580–1591
6. <https://www.nfz.gov.pl/aktualnosci/aktualnosci-oddzialow/profilaktyka-cukrzycy-typu-2-sroda-z-profilaktyka-w-ow-nfz,634.html>
7. Dierschke S.K., Toro A.L., Barber A.J., Arnold A.C., Dennis M.D., *Angiotensin 1-7 attenuates protein O-GlcNAcylation in the retina by EPAC*. Investigative Ophthalmology & Visual Science February, 2020. 61:1-9
8. Semeraro, F., Cancarini, A., dell’Omo, R., Rezzola, S., Romano, M.R., Costagliola, C., *Diabetic retinopathy: vascular and inflammatory disease*. Journal of diabetes research, 2015: 1-13
9. ICO Guidelines for Diabetic Eye Care, February 2014: <https://adst.mp.pl/s/www/mailings/mp/serwisy/okulistyka/ICOGuidelinesforDiabeticEyeCare.pdf>
10. https://eyewiki.aao.org/Diabetic_Retinopathy
11. Tarr, J.M., Kaul, K., Chopra, M., Kohner, E.M., Chibber, R., *Pathophysiology of Diabetic Retinopathy*, ISBN Ophthalmology, 2013: 1-13
12. <https://www.mp.pl/okulistyka/ekspert/136527,angio-oct-nowa-nieinwazyjna-metoda-obrazowania-przeplywu-w-naczyniach-siatkowki>
13. Wasyluk, J., Kaczmarek, I., Myślińska, M., Dubisz, M., *Optyka adaptacyjna- nowa technologia w diagnostyce obrazowej*. Diagnostics, 2020. 1(25): 10-16.
14. Zaleska- Żmijewska, A., Wawrzyniak, Z.M., Dąbrowska, A. et al., *Adaptive Optics (rtx1) High-Resolution Imaging of Photoreceptors and Retinal Arteries in Patients with Diabetic Retinopathy*. Journal of Diabetes Research, 2018. 2019: 1-12
15. Cusick, M., Chew, E.Y., Chan, C.C., et al., *Histopathology and regression of retinal hard exudates in diabetic retinopathy after reduction of elevated serum lipid levels*. Ophthalmology, 2003. 110(11): 2126–2133
16. Debellemanière, G., Flores, M., Tumahai, P. et al., *Assessment of parafoveal cone density in patients taking hydroxychloroquine in the absence of clinically documented retinal toxicity*. Acta Ophthalmol., 2015. 93(7): 534-540

17. Soliman, M.K., Sarwar, S., Hanout, M. et al., *High-resolution adaptive optics findings in talc retinopathy*. Int J Retina Vitreous. 2015. 1: 10.
18. Wu, C.Y., Jansen, M.E., Andrade, J., *Acute Solar Retinopathy Imaged with Adaptive Optics, Optical Coherence Tomography Angiography, and En Face Optical Coherence Tomography*. JAMA Ophthalmol., 2018. 136(1): 82-85
19. Cristescu, I.E. et al. *High-Resolution Imaging of Diabetic Retinopathy Lesions Using an Adaptive Optics Retinal Camera*. Rjo, 2019. 63: 29–34
20. Ro-Mase, T., Ishiko, S., Omar, T., et al., *Association Between Alterations of the Choriocapillaris Microcirculation and Visual Function and Cone Photoreceptors in Patients With Diabetes*. Investigative Ophthalmology & Visual Science June, 2020. 61 (6): 1-9
21. Zaleska-Żmijewska, A., Piątkiewicz, P., Śmigielńska, B., Sokołowska-Oracz, A., Wawrzyniak, Z.M., Romaniuk, D., Szaflik, J., Szaflik, J.P., *Retinal Photoreceptors and Microvascular Changes in Prediabetes Measured with Adaptive Optics (rtxITM): A Case- Control Study*. Journal of Diabetes Research, 2017. 2017: 1-9
22. Arabi, A., Tadayoni, R., Ahmadieh, H., Shahraki, T., Nikkhah, H., *Update on Management of Non-proliferative Diabetic Retinopathy without Diabetic Macular Edema; Is There a Paradigm Shift?* J Ophthalmic Vis Res., 2022. 17(1): 108-117
23. UKPDS Group, *Intensive blood-glucose in patients with type 2 diabetes*. Lancet, 1998. 352(9131): 837–853
24. Do, D.V., Wang, X., Vedula, S.S., Marrone, M., Sleilati, G., Hawkins, B.S., et al., *Blood pressure control for diabetic retinopathy*. Cochrane Database Syst Rev. 2015
25. Mansour, S.E., Browning, D.J., Wong, K., Flynn, H.W. Jr, Bhavsar, A.R., *The Evolving Treatment of Diabetic Retinopathy*. Clin Ophthalmol., 2020. 14: 653-678.
26. Srinivasan, S., Raman, R., Kulothungan, V., Swaminathan, G., Sharma, T., *Influence of serum lipids on the incidence and progression of diabetic retinopathy and macular oedema: Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular genetics Study-II*. Clin Exp Ophthalmol, 2017. 45: 894–900
27. Jicang, Y., *Effect of total retinal laser photocoagulation on diabetic retinopathy*. Medical Equip., 2020. 21: 1002–2376
28. Brown, D.M., Wykoff, C.C., Boyer, D., Heier, J.S., Clark, W.L., Emanuelli, A., et al., *Evaluation of intravitreal aflibercept for the treatment of severe nonproliferative diabetic retinopathy: Results from the PANORAMA randomized clinical trial*. JAMA Ophthalmol, 2021. 139(9): 946–955
29. Mitchell, P., McAllister, I., Larsen, M., Staurenghi, G., Korobelnik, J.F., Boyer, D.S., et al. *Evaluating the impact of intravitreal aflibercept on diabetic retinopathy progression in the VIVID-DME and VISTA-DME studies*. Ophthalmol Retina, 2018. 2: 988–996
30. Maturi, R.K., Glassman, A.R., Josic, K., Antoszyk, A.N., Blodi, B.A., Jampol, L.M., et al., *Effect of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor vs sham treatment for prevention of vision-threatening complications of diabetic retinopathy: The protocol W randomized clinical trial*. JAMA Ophthalmol., 2021. 139(7): 701–712
31. Regula, J.T., Lundh von Leithner, P., Foxton, R., Barathi, V.A., Cheung, C.M.G., Bo Tun, S.B., et al., *Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases*. EMBO Mol Med., 2016. 8: 1265–1288

32. Lin, W.X., Zang, J., Bao, J.L., Zhou, L.B., Zhu, Y.D., Li, Q., *Compound Xueshuantong Capsule and Pancreatic Kikopeptidase in treatment of NPDR*. Int J Ophthalmol, 2011. 11: 66–68
33. Jackson, T.L., Nicod, E., Angelis, A., Grimaccia, F., Pringle, E., Kanavos, P., *Pars plana vitrectomy for diabetic macular edema: a systematic review, meta-analysis, and synthesis of safety literature*. Retina, 2017. 37(5): 886–895
34. Kumagai, K., Hangai, M., Ogino, N., Larson, E., *Effect of internal limiting membrane peeling on long-term visual outcomes for diabetic macular edema*. Retina, 2015. 35(7): 1422–1428
35. Wang, J.H., Roberts, G.E., Liu, G.S., *Updates on gene therapy for diabetic retinopathy*. Curr Diab Rep., 2020. 20: 1-12
36. Li, X.J., Li, C.Y., Bai, D., Leng, Y., *Insights into stem cell therapy for diabetic retinopathy: a bibliometric and visual analysis*. Neural Regen Res., 2021. 16: 172-178
37. Radomska-Leśniewska, D., Skopiński, P., *N-acetylcysteine as an anti-oxidant and anti-inflammatory drug and its some clinical applications*. Cent Eur J Immunology, 2012. 37: 57-66
38. Radomska-Leśniewska, D., Osiecka-Iwan, A., Hyc, A., et al., *Therapeutic potential of curcumin in eye diseases*. Cent Eur J Immunol, 2019. 44: 181-189
39. Bek, T., *Fine structure in diabetic retinopathy lesions as observed by adaptive optics imaging. A qualitative study*. Acta Ophthalmologica, 2014. 92(8): 753-758
40. Cristescu, I.E., *Diabetic retinopathy evaluation through high resolution imaging techniques*. Bucharest: “Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, 2019
41. Lo, J., Dolan, S.E., Kanter, J.R., et al., *Effects of obesity, body composition, and adiponectin on carotid intima-media thickness in healthy women*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006. 91(5): 1677–1682
42. De Jongh, R.T., Serné, E.H., IJzerman, R.G., Stehouwer, C.D.A., *Impaired microvascular function in obesity*, Circulation, 2004. 109 (21): 2529–2535
43. Izzard, A.S., Rizzoni, D., Agabiti-Rosei, E. et al., *Small artery structure and hypertension: adaptive changes and target organ damage*, Journal of Hypertension, 2005. 23(2): 247–250
44. Park, J.B., Schiffrin, E.L., *Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension*. Journal of Hypertension, 2001. 19(5): 921–930
45. Kern, P.A., Di Gregorio, G.B., Lu, T., Ranganathan, G., *Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- expression*, Diabetes, 2003. 52 (7): 1779–1785
46. Kurth, T., Gaziano, J.M., Rexrode, K.M., et al., *Prospective study of body mass index and risk of stroke in apparently healthy women*. Circulation, 2005. 111(15): 1992–1998
47. Singleton, J.R., Smith, A.G., Russell, J.W., *Microvascular complications of impaired glucose tolerance*. Diabetes, 2003. 52 (12): 2867–2873
48. Ro-Mase, T., Ishiko, S., Omar, T. et al., *Association Between Alterations of the Choriocapillaris Microcirculation and Visual Function and Cone Photoreceptors in Patients With Diabetes*. Investigative Ophthalmology & Visual Science June, 2020. 61 (6): 1-9
49. Soliman, M.K., Sadiq, M.A., Agarwaletal, A., *High-resolution imaging of parafoveal cones in different stages of diabetic retinopathy using adaptive optics fundus camera*. PLoS One, 2016. 11: 1-13

50. Cristescu, I.E., Baltă, F., Zăgrean, L., *Cone photoreceptor density in type 1 diabetic patients*. Romanian Journal of Ophthalmology, 2019. 63(2): 153-160
51. Lombardo, M., Parravano, M., *Adaptive optics imaging of parafoveal cones in type 1 diabetes*. Retina, 2014. 34(3): 546-57
52. Tan, W., Wright, T., Rajendran, D., *Cone-Photoreceptor Density in Adolescents With Type 1 Diabetes*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2015. 56: 6339-6343
53. Park, S.P., Chung, J.K., Greenstein, V. et al., *A study of factors affecting the human cone photoreceptor density measured by adaptive optics*. Experimental eye research 2013. 108: 1-9
54. Green, J., Yurdagul, J., McInnis, M.C., et al., *Flow patterns regulate hyperglycemia-induced subendothelial matrix remodeling during early atherogenesis*. Atherosclerosis, 2014. 232: 277-284
55. Ueno, Y., Iwase, T., Goto, K. et al., *Association of changes of retinal vessels diameter with ocular blood flow in eyes with diabetic retinopathy*. Scientific Reports, 2021. 11: 1-12
56. Lammer, J., Prager, S.G., Cheney, M.C. et al., *Cone photoreceptor irregularity on adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy correlates with severity of diabetic retinopathy and macular edema*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2016. 57 (15): 6624–6632
57. Klein, R., Klein, B., Moss, E. et al., *Retinal vascular caliber in persons with type 2 diabetes: The Wisconsin Epidemiological Study of Diabetic Retinopathy: XX*. Ophthalmology, 2008. 115(11): 1859–1868
58. Arichika, S., Uji, A., Murakami, T. et al., *Correlation of retinal arterial wall thickness with atherosclerosis predictors in type 2 diabetes*. Br.J.Ophthalmol, 2017. 101(1): 69-74
59. Chang, H., Ciuffreda, K.J., Jiang, H. et al., *Cone parameters in different vision levels from the adaptive optics imaging*. Medicine 2020. 100: 1-7
60. Kumagai, K., Hangai, M., Ogino, N., Larson, E., *Effect of internal limiting membrane peeling on long-term visual outcomes for diabetic macular edema*. Retina, 2015. 35(7): 1422–1428
61. Estacio, R.O., Jeffers, B.W., Gifford, N., Schrier, R.W., *Effect of blood pressure control on diabetic microvascular complications in patients with hypertension and type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2000. 23: B54-64
62. Nielsen, S.F., Nordestgaard, B.G., *Statin use before diabetes diagnosis and risk of microvascular disease: a nationwide nested matched study*. Lancet Diabetes, Endocrinol. 2014. 2: 894-900
63. Klein, B.E., Myers, C.E., Howard, K.P., Klein, R., *Serum lipids and proliferative diabetic retinopathy and macular edema in persons with long-term type 1 diabetes mellitus: the Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy*. JAMA Ophthalmol, 2015. 133: 503-510
64. Bra^o kenhielm, E., Cao, R., Cao, Y., *Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes*. FASEB J 2001. 15: 1798-1800
65. Ramirez, M., Wu, Z., Moreno-Carranza, B., et al., *Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52: 8944-8950
66. Huang Q, Ding Y, Yu J, et al. (2021): *Induction of differentiation of mesenchymal stem cells into retinal pigment epithelial cells for retinal regeneration by using ciliary neurotrophic factor in diabetic rats*. Curr Med Sci 41: 145-152.

67. Green, J., Yurdagul, J., McInnis, MC., et al., *Flow patterns regulate hyperglycemia-induced subendothelial matrix remodeling during early atherogenesis*. *Atherosclerosis* 2014. 232: 277-284
68. Thompson, D.M., Begg, I.S., Harris, C. et al., *Reduced progression of diabetic retinopathy after islet cell transplantation compared with intensive medical therapy*. *Transplantation*, 2008. 85: 1400-1405
69. Zhang, X., Das, S.K., Passi, S.F. et al., *AAV2 delivery of Flt23k intraceptors inhibits murine choroidal neovascularization*. *Mol Ther*, 2015. 23: 226-234
70. Yang, Y., Liu, Y., Li, Y. et al., *MicroRNA-15b targets VEGF and inhibits angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy*, *J Clin Endocrinol Metab*, 2020. 105: 3404-3415
71. Nielsen, S.F., Nordestgaard, B.G., *Statin use before diabetes diagnosis and risk of microvascular disease: a nation-wide nested matched study*. *Lancet Diabetes, Endocrinol* 2: 894-900
72. Verma, A., Shan, Z., Lei, B. et al., *ACE2 and Ang-(1-7) confer protection against development of diabetic retinopathy*. *Mol Ther* 2012. 20: 28-36
73. Huang, Q., Ding, Y., Yu, J. et al., *Induction of differentiation of mesenchymal stem cells into retinal pigment epithelial cells for retinal regeneration by using ciliary neurotrophic factor in diabetic rats*. *Curr Med Sci* 41: 145-152
74. Sorop, O., Olver, T.D., van de Wouw, J. et al., *The micro-circulation: a key player in obesity-associated cardiovascular disease*. *Cardiovascular Research*, 2017. 113 (9): 1035–1045
75. WHO. *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Report of a WHO Consultation—Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*; WHO: Geneva, Switzerland, 1999.
76. Kempen, J.H., O’Colmain, B.J., Leske, M.C., Haffner, S.M., Klein, R., Moss, S.E., Taylor, H.R., Hamman, R.F., West, S.K., Wang, J.J. et al., *The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States*. *Arch. Ophthalmol*, 2004. 122: 552–563
77. Sohn, E.H., van Dijk, H.W., Jiao, C., Kok, P.H., Jeong, W., Demirkaya, N., et al., *Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016. 113(19): E2655-E2664
78. Burrows, N.R., Hora, I.A., Li, Y.F, Saaddine, J.B., *Self-Reported Visual Impairment Among Persons with Diagnosed Diabetes- United States, 1997–2010*. *MMWR*, 2011. 60: 1549–1553, reprinted in *JAMA*, 2012. 307: 25–27.
79. Nian, S., Lo, A.C.Y., Mi, Y., Ren, K., Yang, D., *Neurovascular unit in diabetic retinopathy: Pathophysiological roles and potential therapeutical targets*. *Eye and Vision*, 2021. 8(1): 15
80. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. *Diabetes Care*, 2004. 27(5):1047-1053
81. Stem, M.S., Gardner, T.W., *Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: Molecular mechanisms and therapeutic implications*. *Current Medicinal Chemistry*. 2013. 20(26): 3241-3250
82. Kusahara, S., Fukushima, Y., Ogura, S., Inoue, N., Uemura, A., *Pathophysiology of Diabetic Retinopathy: The Old and the New*. *Diabetes Metab J.*, 2018. 42(5): 364-376

83. Romero-Aroca P., Baget-Bernaldiz, M., Pareja-Rios, A., Lopez-Galvez, M., Navarro-Gil, R., Verges, R., *Diabetic Macular Edema Pathophysiology: Vasogenic versus Inflammatory*. J Diabetes Res., 2016. 2016: 1-17
84. Kodl, C.T., Seaquist, E.R., *Cognitive dysfunction and diabetes mellitus*. Endocrine Reviews, 2008. 29(4): 494-511
85. Schmidt-Erfurth, U., Garcia-Arumi, J., Bandello, F., Berg, K., Chakravarthy, U., Gerendas, B.S., Jonas, J., Larsen, M., Tadayoni, R., Loewenstein, A., *Guidelines for the Management of Diabetic Macular Edema by the European Society of Retina Specialists (EURETINA)*. Ophthalmologica, 2017. 237(4): 185-222
86. Amoaku, W.M., Ghanchi, F., Bailey, C., Banerjee, S., Banerjee, S., Downey, L., Gale, R., Hamilton, R., Khunti, K., Posner, E., Quhill, F., Robinson, S., Setty, R., Sim, D., Varma, D., Mehta, H., *Diabetic retinopathy and diabetic macular oedema pathways and management: UK Consensus Working Group*. Eye (Lond), 2020: 1-51
87. Gołębowska J, Hautz W. Zastosowanie angio-OCT w diagnostyce i terapii okulistycznej – część I. Ophththerapy. 2016; 3(11): 161-171
88. Hwang TS, Gao SS, Liu L, et al. Automated Quantification of Capillary Nonperfusion Using Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Retinopathy. JAMA Ophthalmol 2016 Jan 21: 1-7
89. Moon BG, Um T, Lee J, Yoon YH. Correlation between Deep Capillary Plexus Perfusion and Long-Term Photoreceptor Recovery after Diabetic Macular Edema Treatment. Ophthalmol Retina. 2018 Mar;2(3):235-243
90. Hwang TS, Jia Y, Gao SS, et al. Optical coherence angiography features of diabetic retinopathy. Retina 2015; 35: 2371-2376
91. Samara, W.A., Say, E., Khoo, C. et al., *Correlation of foveal avascular zone size with foveal morphology in normal eyes using optical coherence tomography angiography*. Retina, 2015. 35: 2188-2195.
92. Park, J.H., Kong, L., Zhou, Y., Cui, M., *Large-field-of-view imaging by multi-pupil adaptive optics*. Nature Methods, 2017. 14(6):581-583
93. Liang, J., Williams, D.R., Miller, D.T., *Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics*. Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision. 1997. 14(11): 2884-2892
94. Paques, M., Meimon, S., Rossant, F., Rosenbaum, D., Mrejen, S., Sennlaub, F. et al., *Adaptive optics ophthalmoscopy: Application to age-related macular degeneration and vascular diseases*. Progress in Retinal and Eye Research, 2018. 66:1-16
95. Bek, T., *Fine structure in diabetic retinopathy lesions as observed by adaptive optics imaging. A qualitative study*. Acta Ophthalmologica, 2014: 92(8): 753-758
96. Baltă, F., Elena Cristescu, I., & Teodora Tofolean, I. (2022). Adaptive Optics Imaging Technique in Diabetic Retinopathy. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.101266
97. Obata, R., Yanagi, Y., *Quantitative analysis of cone photoreceptor distribution and its relationship with axial length, age, and early age-related macular degeneration*. PLoS One, 2014. 9(3): e91873
98. Lombardo, M., Parravano, M., Serrao, S., Ziccardi, L., Giannini, D., Lombardo, G., *Investigation of adaptive optics imaging biomarkers for detecting pathological changes of the cone mosaic in patients with type 1 diabetes mellitus*. PLoS One, 2016. 11(3): e0151380
99. Li, K.Y., Roorda, A., *Automated identification of cone photoreceptors in adaptive optics retinal images*. Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision. 2007. 24(5): 1358-1363

100. De Ciuceis C, Caletti S, Coschignano MA, Rossini C, Duse S, Docchio F, et al. [OP.8C.03] comparison between three non-invasive techniques of evaluation microvascular morphology vs. the gold-standard locally invasive micromyography. Preliminary data. *Journal of Hypertension*. 2017;35: e90
101. Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *American Journal of Hypertension*. 2004;17(12 Pt 1):1192-1200
102. Izzard AS, Rizzoni D, Agabiti-Rosei E, Heagerty AM. Small artery structure and hypertension: Adaptive changes and target organ damage. *Journal of Hypertension*. 2005;23(2):247-250
103. Rizzoni, D., Porteri, E., Guelfi, D., Muiesan, M.L., Valentini, U., Cimino, A. et al. *Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *Circulation*. 2001.103(9): 1238-1244
104. Lombardo, M., Serrao, S., Devaney, N., Parravano, M., Lombardo, G., *Adaptive optics technology for high-resolution retinal imaging*. *Sensors (Basel)*, 2012; 13(1): 334-366
105. Legras, R., Gaudric, A., Woog, K., *Distribution of cone density, spacing and arrangement in adult healthy retinas with adaptive optics flood illumination*. *PLoS ONE*, 2018. 13: e019114
106. National Institutes of Health. *Clinical guidelines on the identification and treatment of overweight and obesity in adults: The evidence report*. *Obes Res* 1998, 6(suppl. 2): 51S-209S
107. Rexrode, K.M., Hennekens, C.H., Willett, C. et al., *A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women*, *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 1997. 277(19): 1539–1545
108. Field, A.E., Coakley, E.H., Must, A. et al., *Impact of over-weight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period*. *Archives of Internal Medicine*, 2001. 161(13): 1581–1586
109. Shankar, A., Sabanayagam, C., Klein, B., *Retinal micro-vascular changes and the risk of developing obesity: pop- ulation-based cohort study*. *Microcirculation*, 2011.18 (8): 655–662
110. Sawides, L., de Castro, A., Burns, S.A., *The organization of the cone photoreceptor mosaic measured in the living human retina*. *Vision Research*. 2017. 132: 34-44
111. Tan, W., Wright, T., Rajendran, D., Garcia-Sanchez, Y., Finkelberg, L., Kisilak, M. et al., *Cone–photoreceptor density in adolescents with type 1 diabetes*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2015. 56(11): 6339-6343
112. Gardiner, T.A., Archer, D.B., Curtis, T.N., Stitt, A.W., *Arteriolar involvement in the microvascular lesions of diabetic retinopathy: implications for pathogenesis*. *Microcirculation*, 2007. 14 (1): 25–38
113. Rogers, S.L., Tikellis, G., Cheung, N. et al., *Retinal arteriolar caliber predicts incident retinopathy. The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle (AusDiab) study*. *Diabetes Care*, 2008. 31: 761–763
114. Matuszewski, W., Gontarz-Nowak, K., Harazny, J.M., Bandurska-Stankiewicz, E., *Evaluation of Morphological Changes in Retinal Vessels in Type 1 Diabetes Mellitus Patients with the Use of Adaptive Optics*. *Biomedicines*. 2022. 10(8):1926

Opinia Komisji Bioetycznej



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel: 022/ 57 - 20 -303
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/.....⁸⁷...../2015

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
po zapoznaniu się z wnioskiem /wymienił wnioskodawcę/ - w dniu 07 kwietnia 2015r.
Prof. dr hab.n. med. Jacek P. Szaflik, Katedra i Klinika Okulistyki,
ul. Sierakowskiego 13, 03-709 Warszawa

dotyczącym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt.: „Ocena morfologii i funkcji fotoreceptorów centralnej siatkówki oraz naczyń siatkówki w wybranych jednostkach chorobowych z zastosowaniem metody optyki adaptywnej.”

wyraża następującą opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi*.
- stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.*

Uwagi Komisji-verte

Pouczenie-w ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje Prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZIOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007 r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.
Komisja działa zgodnie z zasadami GCP.

W załączeniu- skład Komisji oraz lista obecności.

Przewodnicząca
Komisji Bioetycznej

Prof. dr hab. n. med. Maria Roszkowska-Blaim

*niepotrzebne skreślić

Oświadczenia współautorów publikacji

Warszawa, 28.03.2024

Lek. Katarzyna Samelska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Introduction to pathophysiology of diabetic retinopathy” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

korektę artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 90 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

K. Samelska

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonania badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

dr hab. n. med. Anna Zaleska-Żmijewska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Introduction to pathophysiology of diabetic retinopathy” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

przygotowanie koncepcji, korektę artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 8 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 90 %.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

Prof. dr hab. n. med. Jacek P. Szafflik

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Introduction to pathophysiology of diabetic retinopathy” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
korektę artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 90 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

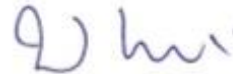
obejmował on: przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstaniu publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

Dr inż. Zbigniew Wawrzyniak

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Relation between Body Mass Index and Retinal Photoreceptor Morphology and Microvascular Change Measured with Adaptive Optics (rx1) High-Resolution Imaging” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

przygotowanie koncepcji, analizę statystyczną.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 14 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 15 %.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie materiału.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

Prof. dr hab. n. med. Jacek P. Szafflik

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Relation between Body Mass Index and Retinal Photoreceptor Morphology and Microvascular Change Measured with Adaptive Optics (rtx1) High-Resolution Imaging” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 15 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przygotowanie koncepcji, korektę artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

dr hab. n. med. Anna Zaleska-Żmijewska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Relation between Body Mass Index and Retinal Photoreceptor Morphology and Microvascular Change Measured with Adaptive Optics (rtx1) High-Resolution Imaging” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 70 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 15 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przygotowanie koncepcji, korektę artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

Dr inż. Zbigniew Wawrzyniak

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Retinal Photoreceptors and Microvascular Changes in the Assessment of Diabetic Retinopathy Progression: A Two-Year Follow-Up Study” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

przygotowanie koncepcji, analizę statystyczną.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 9 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


obejmował on: przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstaniu publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

Prof. dr hab. n. med. Jacek P. Szaflik

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Retinal Photoreceptors and Microvascular Changes in the Assessment of Diabetic Retinopathy Progression: A Two-Year Follow-Up Study” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

korektę artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

objął on: przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

dr hab. n. med. Anna Zaleska-Zmijewska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Retinal Photoreceptors and Microvascular Changes in the Assessment of Diabetic Retinopathy Progression: A Two-Year Follow-Up Study” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

przygotowanie koncepcji, korektę artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Anna Zaleska-Zmijewska

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

Lek. Katarzyna Samelska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Novel therapies for diabetic retinopathy” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

korektę artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 90 %.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

K. Samelska

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

Prof. dr hab. n. med. Piotr Skopiński

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Novel therapies for diabetic retinopathy” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

korektę artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 7 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 90 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

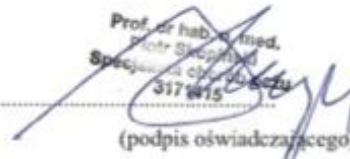
obejmował on: przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Prof. dr hab. n. med.
Piotr Skopiński
Specjalista chorób oczu
317 4415

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 28.03.2024

Prof. dr hab. n. med. Jacek P. Szaflik

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Novel therapies for diabetic retinopathy” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

korektę artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1 %.

Wkład Magdaleny Kupis w powstawanie publikacji określam jako 90 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

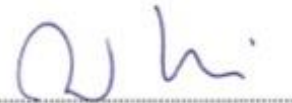
obejmował on: przygotowanie koncepcji, opracowanie materiału, napisanie artykułu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstaniu publikacji)

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Magdaleny Kupis

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników