

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

ȘCOALA DOCTORALĂ

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Rolul conductibilității nervoase în screeningul și diagnosticul neuropatiei la persoanele cu alterarea metabolismului glucidic

---

Doctorand **Georgeta Victoria Inceu**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Nicolae Dragoș Hâncu**

---

CLUJ-NAPOCA 2016



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Diabetul zaharat</b>	17
1.1. Considerații generale	17
1.2. Prevalență	17
1.3. Importanța diabetului zaharat	18
1.3.1. Impactul asupra calității și duratei vieții	18
1.3.2. Impactul economic	18
1.3.3. Impactul socio-profesional	19
<b>2. Neuropatia diabetică</b>	19
2.1. Considerații generale	19
2.2. Definiție și clasificare	21
2.3. Patofiziologie	22
2.3.1. Introducere în sistemul nervos	22
2.3.2. Anomalii morfologice	23
2.3.3. Elemente de fiziopatologie	24
2.3.3.1. Modificările la nivelul vasa vasorum și ischemia endoneuronală	24
2.3.3.2. Teoria metabolică	24
2.3.3.3. Etiopatogenia durerii în neuropatia diabetică	25
2.4. Evaluare și diagnostic	26
2.4.1. Scorul Simptomelor de Neuropatie (NSS)	30
2.4.2. Evaluarea sensibilității protective	30
2.4.3. Evaluarea sensibilității vibratorii	31
2.4.4. Scorul Toronto	32
2.4.5. Măsurarea pragului de percepție a curentului electric cu ajutorul Neurometrului® (Neurotron Inc., Baltimore, Maryland, USA)	32
2.4.6. Microscopia corneană confocală (MCC)	34
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	39
1.1. Ipoteza generală a cercetării personale	39
1.2. Obiectivele cercetării personale	39
<b>2. Metodologie generală</b>	40
2.1. Design-ul studiilor	40
2.2. Selectarea pacienților	40
2.3. Metode folosite pentru evaluarea neuropatiei diabetice periferice	41
2.3.1. Scorul Simptomelor de Neuropatie (NSS)	41
2.3.2. Evaluarea sensibilității protective	42
2.3.3. Evaluarea sensibilității vibratorii	42
2.3.4. Scorul Toronto	43
2.3.5. Măsurarea pragului de percepție a curentului electric cu ajutorul Neurometrului	44
2.3.6. Microscopia corneană confocală	45
2.4. Analiza statistică	47

<b>3. Studiul 1. Cuantificarea pragului de percepție a curentului electric cu ajutorul Neurometrului la pacienții cu diabet zaharat tip 2</b>	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	49
3.3. Material și metodă	49
3.4. Rezultate	50
3.4.1. Analiza descriptivă a lotului studiat	50
3.4.2. Evaluarea pragului de percepție a curentului electric cu ajutorul Neurometrului	52
3.5. Discuții	58
3.6. Concluzii	63
<b>4. Studiul 2. Microscopia corneană confocală în screeningul neuropatiei diabetice la pacienții cu diabet zaharat tip 2</b>	65
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteză de lucru	65
4.3. Material și metodă	66
4.4. Rezultate	66
4.4.1. Analiza descriptivă a lotului studiat	66
4.4.2. Stadializarea severității neuropatiei diabetice în funcție de parametri obținuți prin MCC	69
4.4.3. Relația dintre controlul glicemic și severitatea neuropatiei diabetice	78
4.4.4. Relația dintre tratamentul antihiperglicemiant și severitatea neuropatiei diabetice	82
4.5. Discuții	85
4.6. Concluzii	89
<b>5. Studiul 3. Evaluarea sensibilității și specificității neurometriei și microscopiei corneene confocale comparativ cu scorul Toronto la pacienții cu diabet zaharat tip 2</b>	91
5.1. Introducere	91
5.2. Ipoteză de lucru	91
5.3. Material și metodă	91
5.4. Rezultate	92
5.5. Discuții	98
5.6. Concluzii	100
<b>6. Concluzii generale</b>	101
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	103
<b>REFERINȚE</b>	105
<b>ANEXE</b>	119

**Cuvinte cheie:** neuropatia diabetică, diabet zaharat tip 2, scor Toronto, scorul simptomelor de neuropatie, prag de percepție a curentului electric, Neurometru, , hipoestezie, hiperestezie, fibre nervoase mici nemielinizate, microscopie corneană confocală.

Referințe: 193

## INTRODUCERE

Diabetul zaharat reprezintă una dintre cele mai frecvente boli cronice netransmisibile, devenind o problemă de sănătate publică și luând proporțiile unei epidemii la nivel global. Datorită caracterului său cronic și progresiv, severității complicațiilor pe care le induce, precum și a mijloacelor necesare pentru un management corespunzător, diabetul zaharat reprezintă o boală costisitoare nu numai pentru persoanele afectate și familiile acestora cât și pentru sistemele de sănătate. În acest context, povara financiară și socială impuse de aceasta afecțiune precum și prevalența acesteia în continuă creștere reprezintă argumente mai mult decât convingătoare pentru o abordare care să se axeze în primul rând pe prevenție.

Neuropatia diabetică reprezintă una dintre cele mai frecvente complicații cronice ale diabetului zaharat și una dintre cele mai frecvente forme de neuropatie, în special în țările dezvoltate, asociindu-se cu o largă varietate de manifestări clinice. Forma cea mai frecvent întâlnită la persoanele cu diabet zaharat este polineuropatia diabetică periferică simetrică senzitivo-motorie, asupra căreia ne-am și concentrat în această lucrare. Afectează peste jumătate dintre pacienții cu diabet pe parcursul vieții, fiind considerată un factor de risc major în apariția ulcerărilor picioarelor. Ulcerațiile preced în majoritatea cazurilor amputațiile de membre inferioare, iar diabetul zaharat reprezintă principala cauză de amputații la nivel global. Neuropatia diabetică induce o rată ridicată de morbiditate și mortalitate printre pacienții cu diabet zaharat, astfel încât depistarea cât mai precoce a acestei afecțiuni care să permită aplicarea măsurilor preventive și de educație specifică, este esențială.

Scopul acestei lucrări a fost de a realiza o evaluarea complexă a neuropatiei diabetice periferice prin folosirea unor metode moderne de explorare a statusului fibrelor nervoase.

Lucrarea este structurată în două capitole principale, stadiul actual al cunoașterii care cuprinde o sinteză a evidențelor din literatură pe această temă și contribuția personală, organizată în trei studii observaționale, transversale.

În primul studiu evaluarea neuropatiei diabetice periferice la pacienții cu diabet zaharat tip 2 s-a realizat prin măsurarea pragului de percepție a curentului electric cu ajutorul dispozitivului numit Neurometru, care permite depistarea disfuncționalității a trei categorii de fibre nervoase (mari mielinizate, mari nemielinizate și mici nemielinizate).

În al doilea studiu s-a folosit microscopia corneană confocală pentru depistarea anomaliilor fibrelor nervoase corneene de la nivelul plexului cornean subbazal, metodă neinvazivă, cu o bună reproductibilitate și acuratețe în depistarea precoce a neuropatiei fibrelor mici nemielinizate, considerate a fi primele afectate, încă din stadiile asimptomatice, în neuropatia diabetică. În al treilea studiu s-a folosit scorul Toronto, un instrument validat în screeningul neuropatiei diabetice periferice, prin comparație cu testele electrofiziologice și metodele de evaluare a morfologiei nervilor, pentru aprecierea sensibilității și specificității celor două metode moderne folosite în primele două studii.

Rezultatele obținute au demonstrat utilitatea neurometriei și microscopiei confocale în evaluarea neuropatiei diabetice periferice, superioritatea acestora în raport cu metodele clasice utilizate în screeningul și diagnosticul neuropatiei diabetice, fiind, din cunoștințele noastre, prima lucrare publicată la noi în țară referitoare la aceste metode moderne.

Observațiile desprinse din această lucrare de doctorat deschid noi perspective pentru pacientul cu neuropatie diabetică, prin aplicarea acestor metode neinvazive, reproductibile, sensibile și specifice existând șansa unui diagnostic precoce al neuropatiei diabetice care permite mai departe aplicarea unui management

corespunzător și a măsurilor de educație specifică, toate cu scopul de a îmbunătăți calitatea vieții persoanei cu diabet zaharat.

În realizarea acestei teze am beneficiat de sprijinul firmei Heidelberg care ne-a permis utilizarea unui microscop confocal pentru o perioadă scurtă de timp dar suficientă pentru a ne aduna datele. La interpretarea imaginilor și întocmirea protocolului privind stadializarea severității neuropatiei diabetice am avut sprijinul domnului doctor oftalmolog Horea Demea. De asemenea, ni s-a facilitat utilizarea Neurometrului la pacienții incluși în studiu de către Rețeaua Privată de Sănătate Regina Maria din Cluj-Napoca (măsurătorile le-am efectuat personal).

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### **Studiul 1. Cuantificarea pragului de percepție a curentului electric cu ajutorul Neurometrului la pacienții cu diabet zaharat tip 2**

**Obiective.** Semnele și simptomele neuropatiei diabetice periferice diferă în funcție de tipul de fibre nervoase afectate, aceste subpopulații de fibre nervoase fiind responsabile de transmiterea diverselor tipuri de sensibilități. Cu ajutorul Neurometrului putem identifica statusul funcțional al celor trei tipuri de fibre nervoase (A $\beta$ , A $\delta$  și C), metoda dovedindu-și acuratețea în depistarea, încă din stadiile asimptomatice, a neuropatiei diabetice periferice. Ne-am propus, în acest studiu, evaluarea neuropatiei diabetice periferice prin măsurarea pragului de percepție a curentului electric cu ajutorul Neurometrului, estimarea prevalenței neuropatiei diabetice periferice prin aplicarea acestei metode și asocierea pragului de percepție astfel măsurat cu parametri clinici, biochimici și metabolici.

**Material și metodă.** În acest studiu transversal, observațional au fost incluse 150 de persoane cu diabet zaharat tip 2, conform criteriilor de includere/excludere. Folosind dispozitivul Neurometru, pacienților le-a fost măsurat pragul de percepție a curentului electric, valorile cuprinse între 6 și 13 fiind considerate normale, valorile cuprinse între 1 și 5 indicând prezența hiperesteziei, iar valorile între 14 și 25 indicând prezența hipoesteziei. Atât hipo- cât și hiperestezia definesc prezența neuropatiei senzoriale periferice.

**Rezultate.** În studiul nostru, 52,6% dintre pacienți au prezentat valori anormale ale CPT la cel puțin una dintre cele trei frecvențe aplicate. În evoluția neuropatiei diabetice, se consideră că hiperestezia este prima manifestare care apare, urmată de hipoestezie. În studiul nostru, hipoestezia a fost prezentă într-un procent mult mai mare (15,3%) la aplicarea frecvenței de 5 Hz comparativ cu frecvențele de 250 Hz (6%) sau 2000 Hz (4%), sugerând că frecvența de 5 Hz are o sensibilitate mai mare în a depista valorile anormale comparativ cu celelalte două frecvențe. Această constatare poate sugera faptul că afectarea fibrelor nervoase mici nemielinizate precede afectarea fibrelor nervoase mari mielinizate, fiind astfel în concordanță cu dovezile existente în literatură. Pacienții cu valori anormale ale CPT au prezentat, într-un procent mai mare, hipertensiune arterială, dislipidemie, retinopatie diabetică, arteriopatie cronică obliterantă, dar semnificația statistică a fost atinsă doar pentru ultimele două afecțiuni. Referitor la indicii antropometrici s-au înregistrat diferențe semnificative statistic între valorile IMC-ului și ale circumferinței abdominale la cele două loturi de subiecți. O altă constatare a studiului nostru a fost diferența semnificativă statistic între cele două loturi în ceea ce privește controlul glicemic, reflectat prin valoarea hemoglobinei glicate, pacienții cu valori anormale ale CPT având un control glicemic nesatisfăcător. În cadrul lotului de pacienți considerați cu neuropatie diabetică (cu valori anormale ale CPT) am constatat corelații pozitive și semnificative statistic între vârstă și durata diabetului, între circumferința abdominală și IMC. Am observat, în același timp, o corelație invers proporțională între HDL colesterol și IMC și între HDL colesterol și circumferința abdominală. La aplicarea stimulului electric cu frecvența de 2000 Hz, am obținut o valoare medie a CPT semnificativ mai mare la pacienții cu durata diabetului de peste 10 ani, comparativ cu pacienții cu o vechime mai mică a diabetului zaharat, iar la

aplicarea frecvenței de 5 Hz, valorile CPT au fost semnificativ statistic mai mici la pacienții cu o durată a diabetului mai mică de 5 ani.

**Concluzii.** Rezultatele acestui studiu aduc informații valoroase privind tipurile de fibre nervoase afectate în cazul neuropatiei diabetice periferice. Studiul a evidențiat o serie de factori de risc asociați pozitiv cu prezența neuropatiei diabetice și a demonstrat existența unor corelații între durata diabetului zaharat și subpopulația de fibre nervoase afectate.

## **Studiul 2. Microscopia corneană confocală în screeningul neuropatiei diabetice la pacienții cu diabet zaharat tip 2.**

**Obiective.** Este unanim acceptat faptul că diabetul zaharat are un efect major asupra fibrelor nervoase mici nemielinizate C și asupra fibrelor subțiri mielinizate A delta care deservește funcția vegetativă și percepția termică și dureroasă, fibrele mici nemielinizate fiind primele afectate în neuropatia diabetică. Am urmărit în acest studiu cuantificarea fibrelor nervoase mici, nemielinizate la pacienții cu diabet zaharat tip 2 prin microscopie corneană confocală (o metodă neinvazivă de evaluare a plexului nervos cornean subbazal), stratificarea pacienților pe clase de severitate a neuropatiei diabetice în funcție de modificările observate la nivelul fibrelor nervoase corneene, compararea metodei cu alte teste folosite în depistarea neuropatiei diabetice, precum și corelarea rezultatelor obținute cu parametri clinici, metabolici și biochimici.

**Material și metodă.** Studiul de față a inclus 90 de pacienți cu diabet zaharat tip 2, selectați conform criteriilor de includere/excludere. Am folosit un Heidelberg Retina Tomograf cu un modul Rostok încorporat pentru a analiza plexul cornean subbazal și implicit fibrele nervoase mici nemielinizate de la acest nivel. Interpretarea imaginilor obținute s-a realizat manual prin colaborare cu un medic oftalmolog (Dr. Horea Demea), pe baza parametrilor obținuți (numărul total de fibre nervoase/ imagine, numărul de fibre nervoase lungi, numărul de fibre nervoase scurte, numărul de puncte de conexiune detectate în imagini și raportul dintre numărul de ramuri și numărul de conexiuni) reușind conceperea unui protocol original de stadializare a neuropatiei diabetice pe clase de severitate.

**Rezultate.** Am identificat 88,89% dintre pacienții lotului studiat de noi ca având NDP (37,7% forma ușoară, 38,8% forma moderată și 12,2% forma severă). Durata diabetului a înregistrat un trend ascendent în cadrul claselor de severitate a NDP. În cadrul subgrupului de pacienți cu o durată a diabetului mai mică de 5 ani, prin MCC s-a reușit identificarea unui procent mai mare de pacienți cu NDP, comparativ cu testarea sensibilității protective și cu măsurarea CPT cu frecvența de 5 Hz. S-a observat o asociere pozitivă între controlul glicemic (reflecat prin valoarea HbA1c) și clasele de severitate a NDP, HbA1c înregistrând o tendință crescătoare în cadrul claselor de severitate a neuropatiei diabetice. S-au înregistrat diferențe semnificative statistic ale indicilor antropometrici între pacienții cu aspect normal versus anormal al plexului cornean subbazal. Pacienții insulinotratați au avut durata diabetului zaharat, vârsta medie, scorul Toronto și NSS mai mari comparativ cu pacienții aflați sub terapia non insulinică. Un procent important de pacienți cu sensibilitățile vibratorie și protectivă păstrate și în limite normale, prezentau de fapt modificări morfologice ale plexului cornean subbazal, depistate doar prin MCC.

**Concluzii.** MCC a dovedit o acuratețe superioară în depistarea neuropatiei diabetice comparativ cu neurometria și testarea sensibilității protective, prevalența NDP înregistrând variații importante (deși nu semnificative statistic) în funcție de metoda aplicată. Prin MCC s-au depistat disfuncționalitățile fibrelor nervoase mici nemielinizate încă din stadiile incipiente ale neuropatiei diabetice.

## **Studiul 3. Evaluarea sensibilității și specificității neurometriei și microscopiei corneene confocale comparativ cu scorul Toronto la pacienții cu diabet zaharat tip 2.**

**Obiective.** Polineuropatia diabetică periferică senzitivo-motorie reprezintă o complicație frecventă atât în tipul 1 cât și în tipul 2 de diabet zaharat. Au fost elaborate diverse scoruri clinice pentru a fi utilizate ca

instrumente cantitative în depistarea și stratificare severității NDP. Un astfel de scor este Scorul Toronto, care are avantajul de a fi validat prin comparație cu metodele de evaluare a morfologiei nervilor periferici, fiind considerat un instrument simplu de evaluare a neuropatiei diabetice. Ne-am propus, astfel, în studiul de față să analizăm sensibilitatea și specificitatea neurometriei și MCC comparativ cu scorul Toronto, instrument validat pentru screeningul și diagnosticul NDP.

**Material și metodă.** În acest studiu transversal, observațional, am inclus 90 de pacienți cu diabet zaharat tip 2, selectați conform criteriilor de includere/excludere descrise în capitolul 2, care au fost evaluați din punct de vedere antropometric și metabolic și cărora li s-au aplicat mai multe teste de evaluare a prezenței NDP (NSS, testarea sensibilității protective cu monofilamentul, testarea sensibilității vibratorii, scorul Toronto, măsurarea CPT cu ajutorul Neurometrului, evaluarea fibrelor nervoase corneene prin MCC).

**Rezultate.** În funcție de punctajul obținut în urma calculării scorului Toronto, pacienții studiați au fost împărțiți în două subgrupuri, după cum urmează: pacienți fără NDP dacă scorul Toronto a fost între 0-5 puncte (74,44%, n=67 pacienți) și pacienți cu NDP dacă scorul Toronto a fost mai mare de 6 puncte (25,56%, n=23 pacienți). Dintre pacienții cu un scor Toronto  $\geq 6$  puncte, 23,33% au avut NDP ușoară (scor Toronto 6-8 puncte) și 2,22% NDP moderată (scor Toronto 9-11 puncte). În urma analizelor comparative între cele două subgrupuri de pacienți, cu și fără neuropatie diabetică conform scorului Toronto, am constatat că, în cadrul subgrupului de pacienți cu un scor Toronto peste 6 puncte comparativ cu pacienții care au înregistrat un scor Toronto mai mic de 5 puncte, vârsta a fost mai mare, durata diabetului zaharat a fost semnificativ statistic mai mare, IMC-ul a fost mai mare, circumferința abdominală fost semnificativ statistic mai mare. Referitor la parametri biochimici, am constatat diferențe ale valorilor fracțiunilor lipidice între pacienții cu și fără NDP, dar care nu au atins semnificația statistică. Echilibrul glicemic a fost, de asemenea, diferit în cele două loturi, pacienții cu NDP având o valoare semnificativ mai mare a HbA1c comparativ cu pacienții fără NDP. O constatare importantă a fost că pacienții cu un scor Toronto mai mare de 6 puncte au prezentat valori ale CPT peste 14, pentru toate cele trei frecvențe ale curentului electric alternativ aplicate (încadrându-se astfel la categoria de hipoestezie), deși semnificația statistică a fost obținută doar pentru frecvența de 5 Hz. Rezultatele noastre au arătat, pentru neurometrie, o sensibilitate de 65%, specificitate de 54% și o acuratețe de 56%, comparativ cu scorul Toronto. În schimb, calculând indicatorii statistici separat pentru fiecare frecvență a curentului electric, am constatat specificități mari pentru toate frecvențele (91% pentru 2000 Hz, 93% pentru 250 Hz și 88% pentru 5 Hz) și p semnificativ statistic pentru frecvența de 5 Hz, la un punct de inflexiune de 14,5, ceea ce sugerează faptul că prin măsurarea CPT sunt corect identificați în special cei care nu prezintă NDP. Comparativ cu scorul Toronto, MCC a obținut o sensibilitate de 65%, specificitate de 54% cu o acuratețe de 56%. Sensibilitatea fiind mai mare decât specificitatea, MCC se recomandă a fi folosită pentru detectarea prezenței NDP.

**Concluzii.** Măsurarea pragului de percepție a curentului electric cu ajutorul Neurometrului este o metodă cu o specificitate ridicată (comparativ cu scorul Toronto), indicatorii statistici obținuți sugerând utilitatea metodei în screeningul NDP, metoda având o acuratețe bună în identificarea celor care nu prezintă boala. MCC s-a dovedit a fi o metodă mai mult sensibilă decât specifică, ceea ce reflectă o bună acuratețe a metodei în identificarea celor care au boala (NDP), aducând astfel un aport important în depistarea prezenței NDP.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Lucrarea de față este prima de la noi din țară care a abordat această temă iar studiile efectuate în cadrul cercetării personale sunt, de asemenea, primele din țară care evaluează neuropatia diabetică periferică folosind aceste două metode (măsurarea pragului de percepție a curentului electric cu ajutorul Neurometrului și microscopia corneană confocală). Deși sunt introduse pe piață de mulți ani, la noi în țară criteriul financiar este principalul factor care le limitează aplicabilitatea pe scară largă.

Screeningul și diagnosticul neuropatiei diabetice periferice reprezintă în continuare o provocare pentru clinician, deoarece nu există un consens asupra modalității de efectuare a acestuia. Pe de altă parte, importanța depistării precoce și a gestionării adecvate a neuropatiei diabetice reiese din faptul că, până la 50% dintre pacienți sunt asimptomatici existând astfel un risc mare de leziuni nedureroase, simptomele și deficitul

neuropate afectează calitatea și durata vieții pacienților cu diabet, neuropatia diabetică inducând o rată semnificativă de morbiditate și mortalitate. Deși se cunosc metodele considerate a fi standardul de aur pentru diagnosticul neuropatiei diabetice (testele de conducere nervoasă pentru fibrele nervoase mari mielinizate și explorarea morfopatologică pentru fibrele mici nemielinizate), aceste tehnici sunt laborioase, invazive (biopsia), necesită o dotare adecvată și un personal instruit. Pe de altă parte, informațiile oferite de examenul clinic (istoric și examen obiectiv) depind de gradul de colaborare, implicare și alertă al pacientului, având o mare variabilitate în funcție de toți acești factori.

Rezultatele obținute în urma evaluării neuropatiei diabetice periferice prin măsurarea pragului de percepție a curentului electric cu ajutorul Neurometrului au dovedit valoarea clinică importantă a acestei metode în detectarea disfuncției fibrelor nervoase periferice. Neurometrul are capacitatea de a evalua statusul funcțional a trei categorii de fibre nervoase (mari mielinizate, mici mielinizate și mici nemielinizate), prin măsurarea pragului de percepție a curentului electric la frecvențele de 5Hz, 250Hz și respectiv 2000Hz, dispozitivul cuantificând, într-o mod rapid și neinvaziv, conducerea și integritatea funcțională a celor trei sub-tipuri de fibre nervoase. Această tehnică a dovedit, în studiul nostru, o specificitate superioară în raport cu scorul Toronto (o metodă validată pentru screeningul neuropatiei diabetice periferice), constatare care indică utilitatea metodei în screeningul NDP, demonstrând o acuratețe bună în identificarea celor care nu prezintă boala.

Rezultatele obținute de noi au demonstrat acuratețea microscopiei corneene confocale în diagnosticul neuropatiei diabetice periferice comparativ cu metodele clasice care pot depista neuropatia diabetică doar în stadiile avansate și care evaluează doar statusul fibrelor mari mielinizate. Am demonstrat, aplicând această metodă, că primele afectate în neuropatia diabetică sunt fibrele mici nemielinizate, microscopia corneeană confocală având potențialul de a identifica pacienții cu semne minime de neuropatie. În studiul nostru, prin analizarea morfologiei plexului cornean subbazal am reușit depistarea neuropatiei diabetice la un procent important de pacienți cu o durată a diabetului mai mică de 5 ani. În plus, această metodă a confirmat prezența neuropatiei diabetice la pacienții cu rezultate normale în urma aplicării altor metode de evaluare a neuropatiei diabetice.

Datele prezentate confirmă potențialul acestei metode de a realiza analiza morfologică detaliată a fibrelor nervoase corneene, acționând astfel ca o metodă surogat de evaluare a neuropatiei diabetice. Utilizând parametri înregistrați prin analizarea morfologiei plexului cornean subbazal, a fost posibilă cuantificarea severității neuropatiei diabetice, clasificând astfel pacienții din lotul studiat pe grupe de severitate a neuropatiei diabetice, demonstrând clar asocieri pozitive între severitatea neuropatiei diabetice, pe de o parte și vârsta pacienților, durata diabetului zaharat, controlul glicemic, indicii antropometrici, tratamentul antihyperglicemiant, pe de altă parte. O altă constatare importantă care reiese din studiile efectuate de noi, este sensibilitatea superioară a MCC în raport cu scorul Toronto, ceea ce reflectă o bună acuratețe a metodei în identificarea celor care au boala (neuropatie diabetică periferică).

Elementul inovator al tezei îl reprezintă conceperea unui protocol original de analizare și interpretare a parametrilor obținuți prin MCC (numărul total de fibre nervoase/imagini, numărul de fibre nervoase lungi, numărul de fibre nervoase scurte, numărul de puncte de conexiune detectate în imagini, raportul dintre numărul de ramuri și numărul de conexiuni, tortuozitatea fibrelor nervoase), care poate fi aplicat în practica clinică.

În această lucrare de doctorat am realizat o evaluare complexă a neuropatiei diabetice periferice, deschizând astfel noi perspective și noi oportunități pentru un management corespunzător al pacientului cu diabet zaharat, toate cu scopul de a preveni consecințele devastatoare asociate neuropatiei diabetice. Pentru validarea și consolidarea observațiilor desprinse din această lucrare, ne propunem extinderea cercetării în studii ulterioare.



SUMMARY OF PhD THESIS

# Nerve conductibility role in neuropathy screening and diagnosis in people with impaired glucose metabolism

---

PhD Student **Georgeta Victoria Inceu**

---

PhD Scientific Coordinator Prof.dr. **Nicolae Dragoş Hâncu**

---

CLUJ-NAPOCA 2016



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ŞI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# Table of content

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>CURRENT STATE OF THE ART</b>	
<b>1. Diabetes mellitus</b>	17
1.1. General considerations	17
1.2. Prevalence	17
1.3. Importance of diabetes mellitus	18
1.3.1. Impact on quality and duration of life	18
1.3.2. Economic impact	18
1.3.3. Socio-professional impact	19
<b>2. Diabetic neuropathy</b>	19
2.1. General considerations	19
2.2. Definition and classifications	21
2.3. Physiopathology	22
2.3.1. Introduction in nervous system	22
2.3.2. Morphological anomalies	23
2.3.3. Physiopathology elements	24
2.3.3.1. Modifications of the vasa vasorum and endoneuronal ischemia	24
2.3.3.2. Metabolic theory	24
2.3.3.3. Etiopathology of pain in diabetic neuropathy	25
2.4. Assessment and diagnosis	26
2.4.1. Neuropathy Symptoms Score (NSS)	30
2.4.2. Protective sensation assessment	30
2.4.3. Vibration perception threshold assessment	31
2.4.4. Toronto Score	32
2.4.5. Measurement of current perception threshold using the Neurometer® (Neurotron Inc., Baltimore, Maryland, USA)	32
2.4.6. Corneal confocal microscopy (CCM)	34
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Work hypothesis/objectives</b>	39
1.1. General hypothesis	39
1.2. General objectives	39
<b>2. General methodology</b>	40
2.1. Studies design	40
2.2. Selection of the patients	40
2.3. Methods used in diabetic peripheral neuropathy assessment	41
2.3.1. Neuropathy Symptoms Score (NSS)	41
2.3.2. Protective sensation assessment	42
2.3.3. Vibration perception threshold assessment	42
2.3.4. Toronto Score	43
2.3.5. Measurement of current perception threshold using the Neurometer®	44
2.3.6. Corneal confocal microscopy	45
2.4. Statistical analysis	47

<b>3. Study 1. Quantifying current perception threshold using the Neurometer in patients with type 2 diabetes</b>	49
3.1. Introduction	49
3.2. Work hypothesis/objectives	49
3.3. Material and methods	49
3.4. Results	50
3.4.1. Descriptive analysis of the study group	50
3.4.2. Assessment of current perception threshold using the Neurometer	52
3.5. Discussions	58
3.6. Conclusions	63
<b>4. Study 2. Corneal confocal microscopy in diabetic neuropathy screening in patients with type 2 diabetes.</b>	65
4.1. Introduction	65
4.2. Work hypothesis	65
4.3. Material and methods	66
4.4. Results	66
4.4.1. Descriptive analysis of the study group	66
4.4.2. Staging diabetic neuropathy severity according to the parameters obtained in CCM	69
4.4.3. The relationship between glycemic control and diabetic neuropathy severity	78
4.4.4. The relationship between diabetes treatment and diabetic neuropathy severity	82
4.5. Discussions	85
4.6. Conclusions	89
<b>5. Study 3. Assessing the sensitivity and specificity of corneal confocal microscopy and current perception threshold measurement against Toronto score in patients with type 2 diabetes.</b>	91
5.1. Introduction	91
5.2. Work hypothesis	91
5.3. Material and methods	91
5.4. Results	92
5.5. Discussions	98
5.6. Conclusions	100
<b>6. General conclusions</b>	101
<b>7. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	103
<b>REFERENCES</b>	105
<b>ANNEXES</b>	119

**Keywords:** diabetic neuropathy, type 2 diabetes, Toronto score, Neuropathy Symptoms Score, current perception threshold, Neurometer, hypoesthesia, hyperesthesia, small unmyelinated nerve fibers, corneal confocal microscopy.

References: 193

# INTRODUCTION

Diabetes is one of the most common non-communicable chronic diseases, becoming a public health problem and taking epidemic proportions globally. Due to its chronic and progressive nature, the severity of complications it induces and the means for proper management, diabetes is a costly disease not only for those affected and their families but also for the healthcare systems. In this context, financial and social burden imposed by this disease and its growing prevalence are more than convincing arguments for an approach which focuses primarily on prevention.

Diabetic neuropathy is one of the most frequent chronic complications of diabetes and one of the most common forms of neuropathy, especially in developed countries, being associated with a wide variety of clinical manifestations. The most commonly encountered form in people with diabetes is diabetic peripheral symmetrical sensorimotor neuropathy, the one we are focusing in this paper. It affects more than half of patients with diabetes in their lifetime and is considered a major risk factor in the development of foot ulcers. Ulcers precede most cases of lower limb amputations, and diabetes is recognized as the leading cause of amputations globally. Giving the fact that diabetic neuropathy induces a high rate of morbidity and mortality among patients with diabetes, early detection of the disease as enabling preventive measures and specific education, is essential.

The aim of this study was to conduct a comprehensive evaluation of diabetic peripheral neuropathy by using modern methods of nerve fibers status exploration.

The paper is divided into two main sections, the current state of the art containing a summary of the evidence from the literature on the subject and personal contribution, organized in three observational studies.

In the first study, the assessment of diabetic peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes was achieved by measuring the current perception threshold using the Neurometru device, capable of detecting dysfunction of the three nerve fibers types (large myelinated, large unmyelinated and small unmyelinated nerve fibers).

In the second study we used the corneal confocal microscopy for the detection of abnormalities of nerve fibers of the corneal sub-basal nerve plexus, a non-invasive, good reproducibility method, with high accuracy in the early detection of small fiber neuropathy. The small unmyelinated nerve fibers are considered to be the first affected since the early asymptomatic stage in diabetic neuropathy. In the third study we used the Toronto score, a validated screening instrument for diabetic peripheral neuropathy, which was compared with electrophysiological testing and morphology nerve assessment methods, to evaluate the sensitivity and specificity of the two modern methods used in the first two studies.

The results showed usefulness of current perception threshold measurement and corneal confocal microscopy to evaluate diabetic peripheral neuropathy, their superiority compared to traditional methods used for the screening and diagnosis of diabetic neuropathy, being by our knowledge, the first published work in our country related to this topic.

The observations drawn from this PhD thesis opens up new perspectives for diabetic patients with neuropathic pain, by applying these noninvasive, reproducible, sensitive and specific methods, there is a chance of an early diagnosis of diabetic neuropathy which allows further application of appropriate management and measures of specific education, all in order to improve the quality of life of the person with diabetes.

In achieving this thesis, we have been supported by Heidelberg company that allowed us to use a confocal microscope for a short period of time but enough to gather the data. For the analysis of images and writing the protocol on staging the severity of diabetic neuropathy we had the support of Demea Horea, MD, ophthalmologist. Also, the use of Neurometer was facilitated by "Regina Maria" private healthcare network, Cluj-Napoca (all the measurements were personally performed by the author).

## Personal contribution

### **Study 1. Quantifying current perception threshold using the Neurometer in patients with type 2 diabetes.**

**Objectives.** Signs and symptoms of diabetic peripheral neuropathy differs depending on the type of nerve fibers affected, those subpopulations of nerve fibers being responsible for the transmission of various types of sensitivity. Using the Neurometer we can identify the functional status of these three types of nerve fibers (A $\beta$ , A $\delta$  and C) and the method has been proved its accuracy in early detection, even from asymptomatic stages, of diabetic peripheral neuropathy. We aimed in this study, to assess diabetic peripheral neuropathy by measuring the current perception threshold using Neurometer, to estimate the prevalence of diabetic peripheral neuropathy by this method and to analyze the possible correlation between current perception threshold and clinical, biochemical and metabolic parameters.

**Material and method.** In this observational cross-sectional study, were included 150 people with type 2 diabetes, according to the inclusion / exclusion criteria. By using the Neurometer device, the patients have been measured the current perception threshold and the values between 6-13 were considered normal, the values between 1 and 5 indicated the presence of hyperaesthesia and values between 14 and 25 indicated the presence of hypoesthesia. Both hypo- and hyperaesthesia are defining the presence of sensory neuropathy.

**Results.** In our study, 52.6% of patients had abnormal CPT at least at one of the three frequencies used. In the evolution of diabetic neuropathy, hyperaesthesia is considered the first manifestation that appears, followed by hypoesthesia. In our study, hypoesthesia was present in a much higher percentage (15.3%) when frequency of 5Hz was applied compared with frequency of 250 Hz (6%) or 2000 Hz (4%), suggesting that the frequency of 5 Hz has a higher sensitivity in detecting abnormalities compared to the other two frequencies. This finding may suggest that impairment of small unmyelinated nerve fibers precedes the large myelinated nerve fibers damage, making it consistent with the existing evidence in the literature. Patients with abnormal CPT presented in a higher percentage hypertension, dyslipidemia, diabetic retinopathy, peripheral artery disease but the statistical significance was reached only for the last two conditions. Regarding the anthropometric indexes, we found statistically significant differences between the values of BMI and waist circumference in the two groups of subjects. Another finding of our study was statistically significant difference between the two groups in terms of glycemic control, reflected by glycated hemoglobin, patients with abnormal CPT having unsatisfactory glycemic control. In the group of patients with diabetic neuropathic (with abnormal CPT) we found positive and statistically significant correlations between age and duration of diabetes and between BMI and abdominal circumference. We noticed, a negative correlation between HDL cholesterol and BMI and between HDL cholesterol and abdominal circumference. When applying 2000 Hz electrical stimulus, we obtained a mean CPT significantly higher in patients with diabetes duration more than 10 years, compared with patients with a lower diabetes duration and the CPT values after application of 5 Hz frequency stimulus, were statistically significantly lower in patients with a duration of diabetes less than 5 years.

**Conclusions.** The results of this study provide valuable information on the types of nerve fibers affected in diabetic peripheral neuropathy. The study highlighted a number of positive risk factors associated with the presence of diabetic neuropathy and demonstrated correlations between duration of diabetes and the subpopulation of nerve fibers affected.

### **Study 2. Corneal confocal microscopy in diabetic neuropathy screening in patients with type 2 diabetes.**

**Objectives.** It is widely accepted that diabetes has a major effect on small unmyelinated C nerve fibers and on thin myelinated A delta fibers that serve autonomic perception and painful thermal, small unmyelinated fibers being the first affected in diabetic neuropathy. We aimed in this study to quantify small unmyelinated

nerve fibers status in patients with type 2 diabetes using corneal confocal microscopy (a non-invasive method for assessing corneal sub-basal nervous plexus), to stratify patients into severity classes of diabetic neuropathy based on changes observed in corneal nerve fibers, to compare the method with other tests used to detect diabetic neuropathy and to correlate the results with clinical, metabolic and biochemical parameters.

**Material and method.** This study included 90 patients with type 2 diabetes, selected according to the inclusion / exclusion criteria. We used a Heidelberg Retina Tomograph with a Rostok embedded module to analyze sub-basal corneal nervous plexus and hence small unmyelinated nerve fibers from this level. Interpretation of the images obtained was done manually through collaboration with an ophthalmologist (Dr. Horea DEMEA), and based on parameters we obtained (total number of nerve fibers / image, the number of long nerve fibers, the number of shorter nerve fibers, the number of connection points detected in the images and the ratio of branches and number of connections) we managed to design an original protocol to stage diabetic neuropathy in classes of severity.

**Results.** In our study, we identified 88.89% of patients group as having diabetic peripheral neuropathy (37.7% mild form, 38.8% moderate form and 12.2% severe form). Duration of diabetes has recorded an upward trend across the classes of diabetic peripheral neuropathy severity. In the subgroup of patients with diabetes duration of less than five years, corneal confocal microscopy was able to identify a larger percentage of patients with diabetic neuropathy compared with conventional methods of testing sensibilities and measurement of current perception threshold when applying 5 Hz frequency. It was observed a positive association between glycemic control (reflected by HbA1c) and grades of severity of diabetic peripheral neuropathy, with an increasing trend of HbA1c across the classes of severity of diabetic neuropathy. There were statistically significant differences of anthropometric indices between patients with a normal versus abnormal sub-basal corneal nervous plexus. Insulin treated patients had diabetes duration, the average age, Toronto score and Neuropatic System Score higher compared to patients on non-insulin medication. A significant percentage of patients with vibration perception threshold and protective sensation on normal range, actually showed morphologic changes in sub-basal corneal nervous plexus, identified only by corneal confocal microscopy.

**Conclusions.** Corneal confocal microscopy has proven superior accuracy in detecting diabetic neuropathy compared with current perception threshold measurement (with the Neurometer) and with loss of protective sensation testing. We found important (though not statistically significant) variations in prevalence of diabetic peripheral neuropathy, depending on the method applied. Using Corneal confocal microscopy, we were able to detect small unmyelinated nerve fibers damage, from the early stages of diabetic neuropathy.

### **Study 3. Assessing the sensitivity and specificity of corneal confocal microscopy and current perception threshold measurement against Toronto score in patients with type 2 diabetes.**

**Objectives.** Peripheral sensorimotor diabetic polyneuropathy is a common complication in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. Various clinical scores were developed as quantitative tools in detecting DPN and for stratification by severity classes of diabetic neuropathy. Such a score is the Toronto score, which has the advantage of being validated by comparison with methods of peripheral nerves morphology evaluation, and it is considered a simple tool for assessing diabetic neuropathy. We aim in this study to analyze the sensitivity and specificity of corneal confocal microscopy and current perception threshold measurement compared with the Toronto score, a validated tool for the screening and diagnosis of diabetic peripheral neuropathy.

**Material and method.** In this cross-sectional observational study, we included 90 patients with type 2 diabetes, according to the for inclusion / exclusion criteria, which were evaluated in terms of anthropometric and metabolic measurement and on which were applied more tests for assessing the presence of diabetic peripheral neuropathy (NSS, testing for loss of protective sensation using Semmes-Weinstein monofilament,

testing for vibration perception threshold using a tuning fork, Toronto score, CPT measurement using the Neurometer, assessment of corneal nerve fibers through corneal confocal microscopy).

**Results.** Depending on the values we obtained after applying the Toronto score, the patients were divided into two subgroups as follows: patients without DPN if the Toronto score was 0-5 points (74.44%, n = 67 patients) and patients with DPN if Toronto score was more than 6 points (25.56%, n = 23 patients). Among patients with a Toronto score  $\geq$  6 points, 23.33% had mild DPN (Toronto score between 6-8 points) and 2.22% had a moderate DPN (Toronto score between 9-11 points). After comparative tests between the two subgroups of patients with and without diabetic neuropathy according to the Toronto score, we found that in the subgroup of patients with a Toronto score over 6 points compared with patients who recorded Toronto score of less than 5 points, age was higher, duration of diabetes was significantly higher, BMI was higher, waist circumference was significantly higher. Regarding the biochemical parameters, we found differences in lipid fractions values between patients with and without DPN, but without statistical significance. Glycemic control was also different in the two groups, patients with DPN having a HbA1c value significantly greater compared with patients without DPN. An important finding was that patients with a Toronto score more than 6 points showed values of CPT over 14 for all three frequencies of alternating current stimulus applied (hypoesthesia), although statistical significance was obtained only for the frequency of 5 Hz. Our results have shown a 65% sensitivity, 54% specificity and 56% accuracy for current perception threshold measurement compared with the Toronto score. Instead, after calculating statistical indicators separately for each frequency of electrical stimulus applied, we found high specificity for all frequencies (91% for 2000 Hz, 93% for 250 Hz and 88% for 5 Hz) and statistical significant p value for the 5 Hz frequency, at an inflection point of 14.5, which suggests that by measuring CPT are correctly identified especially those which do not show the DPN. Compared to Toronto score, corneal confocal microscopy has achieved a 65% sensitivity, 54% specificity and 56% accuracy. The sensitivity is higher than specificity, so CCM is recommended to be used for determining NDP.

**Conclusions.** Measuring the current perception threshold using the Neurometer is a method with high specificity (compared to Toronto score), the statistical indicators we obtained suggesting the utility as a screening method for DPN, with good accuracy in identifying the patients without the disease. CCM, on the other hand, has proved to be a more sensitive method, which reflects the accuracy of the method in identifying the patients who have the disease (DPN), thus bringing an important contribution in detecting diabetic peripheral neuropathy.

## Originality and innovative contributions of the thesis

This paper is the first in our country that has addressed this issue and the studies included in the personal research are also the first in the country to evaluate diabetic peripheral neuropathy using these two methods (measuring the current threshold using the Neurometer and corneal confocal microscopy). Although marketed for many years, in our country financial criterion is the main factor limiting their widespread applicability.

Screening and diagnosis of diabetic peripheral neuropathy remains a challenge for the clinician, because there is no consensus on how to conduct it. On the other hand, the importance of early detection and proper management of diabetic neuropathy stems from the fact that up to 50% of patients are asymptomatic leading to a high risk of painless lesions, symptoms and neuropathic deficits affects the quality and duration of life of patients with diabetes, diabetic neuropathy inducing a significant rate of morbidity and mortality. Although known and conventional methods considered to be the gold standard for the diagnosis of diabetic neuropathy (nerve conduction studies for large myelinated nerve fibers and morphopathological exploration for small unmyelinated nerve fibers), these techniques are laborious, invasive (biopsy), requires appropriate endowment and trained staff. On the other hand, the information provided by clinical examination (history and physical exam) depend on the degree of cooperation, involvement and alert status of the patient, having a great variability depending on all these factors.

The results obtained from the evaluation of diabetic peripheral neuropathy by measuring the current perception threshold using the Neurometer proved significant clinical value of this method in detecting dysfunction of peripheral nerve fibers. Neurometer has the ability to assess the functional status of the three

types of nerve fibers (large myelinated, small myelinated and small unmyelinated) by measuring the current perception threshold at 5 Hz, 250Hz, respectively 2000Hz frequencies, and the device is quantifying in a quickly and non-invasively way the management and functional integrity of the three sub-types of nerve fibers. This technique has been shown, in our study, a higher specificity compared to Toronto score (a validated method for diabetic peripheral neuropathy screening), a finding which indicates the usefulness of the method in screening for DPN, showing good accuracy in identifying the patients without the disease.

Our results demonstrated the corneal confocal microscopy accuracy in the diagnosis of diabetic peripheral neuropathy compared with conventional methods that can detect diabetic neuropathy only in advanced stages and which are able to assess only large myelinated nerve fibers status. We demonstrated, applying this method, that the first affected in diabetic neuropathy are small unmyelinated nerve fibers, corneal confocal microscopy having the potential to identify patients with minimal signs of neuropathy. In our study, by analyzing the morphology of sub-basal corneal nervous plexus, we could detect diabetic neuropathy in a significant percentage of patients with diabetes duration of less than five years. In addition, this method confirmed the presence of diabetic neuropathy in patients with normal results after the application of other conventional methods for assessing diabetic neuropathy.

Data presented in this PhD paper confirms the potential of this method to carry out detailed morphological analysis of corneal nerve fibers, thus acting as a surrogate method for assessing diabetic neuropathy. Using parameters recorded by analyzing the sub-basal corneal nervous plexus morphology, it was possible to quantify the severity of diabetic neuropathy, classifying the patients into classes of severity of diabetic neuropathy, clearly demonstrating the positive association between severity of diabetic neuropathy, on the one hand and patient age, diabetes duration, glycemic control, anthropometric indices, diabetes treatment, on the other hand. Another important finding emerging from the studies we performed is the high sensitivity of corneal confocal microscopy compared with Toronto score, which reflects the accuracy of the method in identifying those who have the disease (diabetic peripheral neuropathy).

The innovative element of the thesis is the development of an original protocol of analysis and interpretation of parameters obtained by CCM (the total number of nerve fibers / image, the number of long nerve fibers, the number of short nerve fibers, the number of connection points detected in images, the ratio of the number of branches and number of connections, the nerve fibers tortuosity) that can be applied in clinical practice.

In this PhD thesis we conducted a comprehensive evaluation of diabetic peripheral neuropathy, thus opening up new perspectives and opportunities for the proper management of the diabetic patient, all in order to prevent the devastating consequences associated with diabetic neuropathy. To validate and strengthen observations drawn from this paper, we propose expanding the research in future studies.