




## Araştırma Makalesi | Research Article

# TİP 2 DİYABETES MELLİTUS HASTALARININ İN VİVO KORNEAL KONFOKAL MİKROSKOPİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

## EVALUATION OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS BY IN VIVO CONFOCAL MICROSCOPY

 Müge Toprak<sup>1</sup>,  Özgül Altıntaş<sup>2</sup>,  Büşra Yılmaz Tuğan<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Özel Pendik Dünya Göz Tıp Merkezi, Göz Hastalıkları Kliniği, İstanbul, Türkiye. <sup>2</sup>Acıbadem Maslak Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, İstanbul, Türkiye. <sup>3</sup>Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye.



### Öz

**Amaç:** İn vivo konfokal mikroskopi (İVKM), periferik sinir sisteminin küçük lifleri olan subbasal kornea sinir liflerini değerlendirmek için hızlı, invaziv olmayan bir yöntemdir. Kornea sinir lifi değişiklikleri diyabetik periferik nöropatinin bir belirteci olabilir. Bu çalışmanın amacı İVKM yöntemini kullanarak diyabetes mellitus (DM) tanısı olan hastalardaki olası korneal sinir lifi değişikliklerini incelemektir.

**Yöntem:** Tip 2 DM tanılı hastaların kornea innervasyon paternini İVKM kullanarak inceledik. DM hastaları ile kontrol grubunun korneal parametreleri karşılaştırıldı. DM hastalarının hemogloblin A1c (HbA1c) değerleri ve hastalık süreleri kaydedildi ve korneal parametreler ile korelasyonuna bakıldı.

**Bulgular:** Yaş ortalaması 54,2±10,6 olan toplam 31 DM hastası ve yaşları eşleştirilmiş (51,1±10,0 yıl) 30 kontrol grubu değerlendirildi. Korneal epitel sayısı DM grubu ile kontrol grubunda benzerdi. Korneal subbasal pleksus (SBP) yoğunluğu DM grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı düşüktü (p=0,001). SBP gövde yoğunluğu DM grubunda istatistiksel anlamlı azdı (p=0,038). SBP dal yoğunluğu DM grubunda, kontrol grubuna kıyasla düşüktü (p=0,095).

**Sonuç:** Konfokal mikroskopi, in vivo olarak kornea sinir liflerindeki değişiklikleri göstermek için değerli bir araçtır. Bu teknik, diyabetik sinir lifi hasarını daha erken gösterme yeteneğine sahip olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** İn vivo korneal konfokal mikroskopi, diyabetes mellitus, korneal subbasal pleksus

### ABSTRACT

**Objective:** In vivo confocal microscopy (IVCM) is a rapid, noninvasive method to evaluate subbasal corneal nerve fibers, which are small fibers of the peripheral nervous system. Corneal nerve fiber changes may be a marker of diabetic peripheral neuropathy. The aim of this study is to examine possible corneal nerve fiber changes in patients with diabetes mellitus (DM) using IVCM method.

**Methods:** We examined the corneal innervation pattern of patients with type 2 DM using IVCM. Corneal parameters of DM patients and control groups were compared. Hemoglobin A1c (HbA1c) values and disease duration of DM patients were recorded and their correlation with corneal parameters was evaluated.

**Results:** A total of 31 DM patients aged 54.2±10.6 years and 30 age-matched (51.1±10.0 years) control groups were evaluated. The number of corneal epithelium was similar in the DM group and control group. Corneal subbasal plexus (SBP) density was significantly lower in the DM group compared to the control group (p=0.001). SBP trunk density was significantly decreased in the DM group (p=0.038). SBP branch density was lower in the DM group compared to the control group (p=0.095).

**Conclusion:** Confocal microscopy is a valuable tool for demonstrating changes in corneal nerve fibers in vivo. This technique may have the ability to show diabetic nerve fiber damage earlier.

**Keywords:** In vivo corneal confocal microscopy, diabetes mellitus, corneal subbasal plexus

\*İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: Büşra Yılmaz Tuğan; Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Umuttepe, Kocaeli, Türkiye.

Telefon/Phone: +90 (262) 303 75 75 e-posta/e-mail: busrayilmaz87@hotmail.com

Başvuru/Submitted: 27.08.2023

Kabul/Accepted: 20.09.2023

Online Yayın/Published Online: 21.10.2023



## Giriş

Uluslararası Diyabet Federasyonu, şu anda dünya çapında 463 milyon insanın diyabetes mellitus (DM) ile yaşadığını tahmin ediyor ve bu sayının 2030'a kadar 575 milyonu aşacağını öngörüyor.<sup>1</sup> Diyabetik periferik nöropati (DPN), DM'li hastaların en az %50'sini etkileyen, diyabetin en sık görülen uzun vadeli komplikasyonlarından biridir ve tip 2 diyabet tanısı alan hastalarda diyabetle ilişkili mortalite için bağımsız bir belirteçtir.<sup>2,3</sup>

Başlangıçta küçük miyelinsiz C liflerini etkileyen duysal kayıp ve ağrı, ardından büyük, miyelinli sinir lifi tutulumu ile karakterizedir. Diyabetik nöropati esas olarak periferik sinir duyarlılığının kaybı ile ilişkilidir.<sup>4</sup> Küçük sinirler en sık etkilenen liflerdir ve bunların kaybı ayak ülserasyonuna, Charcot nöroartropatisine ve alt ekstremitte amputasyonuna yol açar.<sup>5,6</sup> Periferik sinir sisteminin bir bileşeni olarak kabul edilen korneanın subbazal sinir pleksusu da benzer şekilde etkilenebilir ve hasar, somatik sinir bozukluğunun ciddiyeti ile doğrudan ilişkilidir.<sup>4,7</sup>

İn vivo konfokal mikroskopi (İVKM) araştırmacıların kornea katmanlarını doğru bir şekilde incelemesine izin veren invaziv olmayan bir tekniktir ve nöropatinin erken teşhisi için geçerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir.<sup>6</sup> Küçük lif nöropatisinin tanısında standart metot deri punch biyopsisidir, ancak bu yöntemin invaziv olması ve profesyonel laboratuvarında değerlendirme gerektirmesi yeni yöntemlerin araştırılmasını teşvik etmektedir. Yapılan çalışmalar İVKM'nin korneal subbazal sinir pleksusunu ölçerek diyabetik periferik nöropatisi olan ve olmayan hastaları noninvaziv ve hızlı bir şekilde ayırt edebildiğini ortaya koymuştur.<sup>6-8</sup> Ayrıca, birkaç çalışma, korneal konfokal mikroskopinin, deri punch biyopsisi ile ilişkili bozulmuş glukoz toleransı olan vakalarda küçük lif hasarını tespit edebildiğini göstermiştir. Diyabetli hastalarda intra-epidermal sinir lifi yoğunluğunda (IENFD) ve akson refleks aracılı vazodilatör yanıtta erken bir azalma vardır ve bu da subklinik patolojiyi gösterir.<sup>9</sup>

Diyabetik periferik nöropatinin tanısı, nöropatinin semptomlarına ve/veya bulgularına ve yalnızca büyük lif fonksiyonunu yansıtan sinir iletim çalışmalarına (NCS) dayanmaktadır, ancak önceki çalışmalar, diyabette periferik sinirlerde en erken hasarın küçük lif sinirlerini içerdiğini öne sürmüşlerdir.<sup>10-12</sup> Bu çalışmanın amacı İVKM yöntemini kullanarak DM tanısı olan ancak diyabetik retinopati gelişmemiş hastalardaki olası korneal sinir lifi değişikliklerini incelemektir.

## Yöntem

### Hastalar

Çalışma Helsinki Deklarasyonu ilkelerine uygun olarak yapıldı ve Kocaeli Üniversitesi Etik Kurulu çalışma planını onayladı. Çalışmaya yazılı bilgilendirilmiş onam veren katılımcılar dahil edildi. 40 ila 60 yaş arası ve ADA (Amerikan Diyabet Derneği)'ya göre tip 2 DM ve diyabetik retinopati bulgusu olmayan 31 hastanın 31 gözü ve 30 sağlıklı kontrolün 30 gözü çalışmaya dahil

edildi. Katılımcıların çalışmaya yalnızca sağ gözleri dahil edilmiştir.

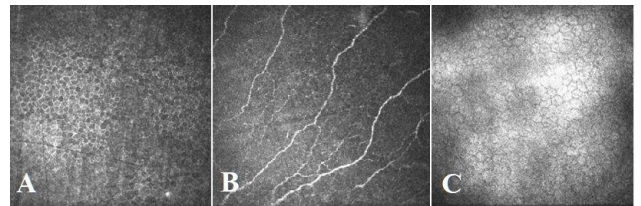
Tüm katılımcılara görme keskinliği testi, ön segment biyomikroskopisi, göz içi basıncı değerlendirmesi ve fundus muayenesi dahil olmak üzere tam bir oftalmolojik değerlendirme yapıldı. Diyabetli hastalara nöropati semptom profili (NSP) değerlendirmesi yapıldı. Nöropatisi olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca diyabetik popülasyonun sıklıkla eşlik eden hastalıkları olmasına rağmen, yalnızca hipergliseminin insan gözü üzerindeki etkilerini incelemek için hipertansiyon, hiperlipidemi veya diğer kardiyovasküler hastalıklardan etkilenmiş olan bireyleri çalışma dışında tuttuk.

Kontakt lens kullanma veya refraktif cerrahi, malignite, B12 vitamini eksikliği, ailesel kalıtsal periferik nöropati, korneayı etkilediği bilinen sistemik hastalık, aktif diyabetik ayak ülserasyonu, kronik kornea patolojileri, oküler travma veya önceki oküler cerrahi öyküsü olanlar çalışma dışı bırakıldı.

### Kornea Konfokal Mikroskopisi

Kornea görüntüleri bir Heidelberg Retina Tomografisi (HRT III, Rostock Cornea Module, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Almanya) kullanılarak alınmıştır. Kornea bütünlüğü yarık lamba muayenesi ile doğrulandı. Lokal anestezi olarak %0,4 benoksinat hidroklorür kullanıldı ve lens ile tek kullanımlık lens kapağı arasına bir damla Viscotears® Sıvı Jel kullanıldı.

İVKM ile merkezi korneanın tüm derinliği boyunca, özellikle alt bazal sinir tabakası boyunca dört tarama döngüsü gerçekleştirildi. Derinlik, odak konumu ve kontrast kriterleri izlenerek göz başına 3 görüntü seçildi. Görüntü başına piksel sayısı 300 dpi idi. ImageJ yazılımı (sürüm 1.41, Ulusal Sağlık Enstitüleri, ABD) kullanılarak hasta teşhisi bilgisi olmadan korneal sinir ölçümü kör bir şekilde gerçekleştirildi. Çalışılan parametreler,  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  cinsinden ifade edilen korneal sinir uzunluğu ve kalınlığını içermektedir. Görüntü bölümünün her bir lifi ölçülerek sinir kalınlığı ve uzunluğu değerlendirildi ve tüm uzunluk boyunca sinirleri ölçerek sinir kalınlık değerleri elde edildi. Korneal epitel sayısı (no./ $\text{mm}^2$ ), kornea sinir lifi yoğunluğu (no./ $\text{mm}^2$ ), korneal endotel sayısı (no./ $\text{mm}^2$ ) ve kornea sinir gövdesi yoğunluğu (majör no./ $\text{mm}^2$ ) değerlendirildi (Şekil 1). DM hastalarının HbA1c değerleri ve hastalık süreleri kaydedildi ve korneal parametreler ile korelasyonuna bakıldı.



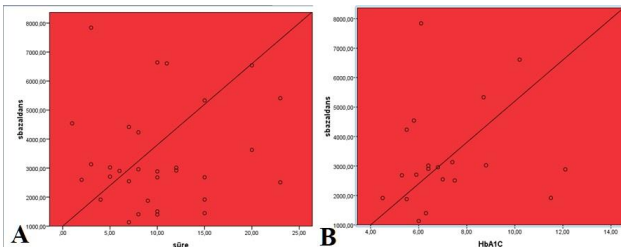
**Şekil 1.** İn vivo korneal konfokal mikroskopide (İVKM) korneal epitel (A), subbazal sinir pleksusu (B) ve korneal endotelin (C) değerlendirilmesi

## İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, ABD) ve MedCalc 14.0 kullanılarak yapıldı. Normallik varsayımını değerlendirmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Sayısal değişkenler, ortalama±standart sapma veya (normal dağılım olmaması durumunda) medyan (25.-75. yüzdeler) ile normal dağılıma bağlı olarak sunuldu. Kategorik değişkenler sayı (yüzde) olarak özetlendi. Gruplar arasındaki sayısal değişkenlerin karşılaştırılması, hangisi uygunsa, bağımsız örneklem t-testi/Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon analizi ile ve iki kategorik değişken arasındaki ilişki Ki-kare testi ile incelendi. İstatistiksel anlamlılık için  $p$  değeri  $<0,05$  yeterli kabul edildi.

## Bulgular

Yaş ortalaması  $54,2\pm 10,6$  olan toplam 31 DM hastası ve yaşları eşleştirilmiş ( $51,1\pm 10,0$  yıl) 30 kontrol grubu değerlendirildi. DM olgularında hastalık süresi ortalama  $9,7\pm 3,5$  yıldır ve olguların HbA1c değerleri ortalama  $7,76\pm 0,82$  idi (Tablo 1). DM ve kontrol grubuna ait korneal değerler Tablo 2'de gösterilmiştir. Korneal epitel sayısı diyabetik grupta  $5863,9\pm 700,0$ ; kontrol grubunda  $5875,8\pm 1146,0$  / $\text{mm}^2$  idi ( $p=0,961$ ). Korneal subbazal pleksus (SBP) yoğunluğu diyabetik grupta ( $3366,1\pm 1764,8$  / $\text{mm}^2$ ) kontrol grubuna ( $9369,1\pm 2838,37$  / $\text{mm}^2$ ) göre anlamlı düşüktü ( $p<0,001$ ). SBP gövde yoğunluğu diyabetik grupta  $30,7\pm 8,5$  / $\text{mm}^2$ ; kontrol grubunda  $36,8\pm 9,8$  / $\text{mm}^2$  olup diyabetik grupta istatistiksel anlamlı azdı ( $p=0,011$ ). SBP dal yoğunluğu diyabetik grupta  $50,7\pm 26,0$  / $\text{mm}^2$ ; kontrol grubunda  $63,2\pm 15,3$  / $\text{mm}^2$  ( $p=0,025$ ) idi. Korneal endotel sayısı diyabetik grupta ( $2883,4\pm 508,6$  no./ $\text{mm}^2$ ) kontrol grubuyla ( $2987,0\pm 543,5$  no./ $\text{mm}^2$ ) benzerdi ( $p=0,441$ ). HbA1c ve hastalık süresi ile tüm korneal konfokal mikroskopi parametreleri arasında korelasyon olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ) (Şekil 2). İVKM, kornea yaralanması veya keratit riski çok düşük olan bir kornea temas tekniğidir; ancak hastalarımızda bu komplikasyonlardan herhangi biri gelişmedi.



**Şekil 2.** Korneal subbazal sinir pleksusu yoğunluğunun hastalık süresi (A) ve HbA1C değerleri (B) ile korelasyonu

**Tablo 1.** DM ve kontrol grubunun demografik ve klinik verileri

	DM grubu	Kontrol grubu	p
Yaş (yıl)	$54,2\pm 10,6$	$51,1\pm 10,0$	0,241*
Cinsiyet (n)			1,0**
Kadın	14	15	
Erkek	17	16	
Hastalık süresi (yıl)	$9,7\pm 3,5$	-	-
HbA1C (%)	$7,76\pm 1,3$	$4,31\pm 1,6$	$<0,001^*$

DM: Diyabetes Mellitus, SBP: Subbazal Pleksus

\*Bağımsız örneklem t-testi

\*\*Ki-kare testi

**Tablo 2.** DM ve kontrol grubunun korneal konfokal mikroskopi parametreleri

	DM grubu	Kontrol grubu	p*
Epitel	$5863,9\pm 700,0$	$5875,8\pm 1146,0$	0,961
SBP Yoğunluğu	$3366,1\pm 1764,8$	$9369,1\pm 2838,3$	$<0,001$
SBP Gövde	$30,7\pm 8,5$	$36,8\pm 9,8$	0,011
SBP Dal	$50,7\pm 26,0$	$63,2\pm 15,3$	0,025
Endotel	$2883,4\pm 508,6$	$2987,0\pm 543,5$	0,441

DM: Diyabetes Mellitus, SBP: Subbazal Pleksus

\*Bağımsız örneklem t-testi

## Tartışma

Çalışmamızda diyabetik retinopati bulgusu olmayan tip 2 DM hastalarında korneal konfokal mikroskopi bulgularını inceledik. DM grubunun subbazal sinir lifi yoğunluğunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. Ana sinir gövdeleri ve dal yoğunluğu incelendiğinde DM olan hastalarda azalma olduğu görüldü. Aradaki fark istatistiksel anlamlılığa oldukça yakındı. Zayıf glisemik kontrol, DM'de daha yüksek komplikasyon prevalansı ile ilişkili olmasına rağmen, HbA1c ile konfokal mikroskobik değişkenler arasında herhangi bir korelasyon bulamadık.

Diyabetli hastalarda intra-epidermal sinir lifi yoğunluğunda (IENFD)<sup>7</sup> ve akson refleksi aracılı vazodilatör yanıtta<sup>8</sup> erken bir azalma vardır ve bu da subklinik patolojiyi gösterir. Diyabetik periferik nöropati, diyabetin en sık görülen uzun vadeli komplikasyonlarından biridir<sup>2</sup> ve tip 2 DM tanısı alan hastalarda diyabetle ilişkili mortalite için bağımsız bir belirteçtir.<sup>3</sup> İntraepidermal sinir liflerinin (IENF) ölçümü, küçük lif nöropatisinin mevcut altın standart ölçüsüdür.<sup>13</sup> Ancak bu, cilt biyopsisi gerektiren minimal invaziv bir prosedürdür. Giderek artan sayıda veri, korneal konfokal mikroskopinin hem yerleşik hem de erken diyabetik nöropatiyi teşhis etmek için kullanılabileceğini düşündürmektedir.<sup>14-18</sup> IENFD ile İVKM kullanılarak elde edilen korneal sinir morfolojisi arasında bir korelasyon gösterilmiştir.<sup>15</sup>

Tip 2 DM'de sudomotor fonksiyon ve kornea sinir lifi patolojisi arasındaki ilişkisinin incelendiği bir çalışmada Korneal sinir liflerinin morfolojik parametreleri, sudomotor fonksiyonu normalden, diyabetik nöropati gelişmesinden önce (evre I) bozulduğu gösterilmiştir; bu nedenle, C lifi hasarının, sudomotor disfonksiyonun gelişiminde hiyerarşik bir rol oynayabileceği düşünülmüştür.<sup>19</sup> Erken kornea sinir lifi hasarı, sinir iletimindeki değişikliklerden önce bozulmuş glikoz toleransı olan kişilerde gösterilmiştir.<sup>17,18</sup> Benzer şekilde bu çalışmada klinik nöropatisi olmayan Tip 2 DM'li

katılımcılarda korneal sinir ölçümlerinde anlamlı bir azalma gözlemedik. Bu, diyabette nöronal hasarı gösteren erken değişiklikleri tespit etmede in vivo korneal konfokal mikroskopik kullanımını destekler. Yapılan başka bir çalışmada Nöropatisi olmayan Tip 2 DM'li katılımcılarda kornea sinir lifi yoğunluğundaki değişikliklerin belirgin olduğu gösterilmiştir.<sup>20</sup> İVKM'nin bir sınırlaması, herhangi bir zamanda toplam subbazal sinir pleksusunun yalnızca bir kısmının taranmasına izin veren nispeten küçük görüş alanına sahip olmasıdır. Çalışmamızda benzer şekilde diyabetik nöropati gelişmemiş diyabetik hastalarda korneal sinir liflerinde değişiklikler olduğunu gösterdik. Bitirgen ve ark. DM hastalarında yaptıkları korneal konfokal çalışmasında HbA1c ile korneal mikroskopik değişikliklerde bir korelasyon saptamamış.<sup>21</sup> Farklılığın olmamasının olası bir açıklaması, HbA1c değerlerinin in vivo korneal konfokal mikroskopik incelemesi sırasında ölçülmesi ve bu nedenle komplikasyonlarla daha yakından ilişkili olabilecek önceki glisemik durumu doğru şekilde yansıtmaması olabileceği ileri sürülmüştür. Biz de çalışmamızda, önceki çalışmalara benzer şekilde HbA1c değerleri ile korneal konfokal mikroskopik parametreleri arasında ilişki saptamadık.

Mevcut çalışmanın en büyük kısıtlaması, çalışmanın küçük boyutu ve aynı zamanda randomizasyon ve plasebo kontrolünün olmamasıdır. Bu nedenle bulgularımızı doğrulamak için aktif müdahalenin yapıldığı daha büyük, randomize bir çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, bu çalışma diyabetik nöropatili ve diyabetik nöropati gelişmemiş tip 2 DM hastalarında, korneal sinir lifi tabakasında değişiklikler olduğunu göstermiştir. İENFD'nin belirlenmesi için invaziv bir deri biyopsisi gerektiğinden, İENFD, küçük C liflerinin morfolojisini değerlendirmek için rutin bir klinik prosedür olarak kullanılamaz. Bununla birlikte, özellikle korneal sinir anormallikleri, diyabetik retinopati gelişmeden önce ortaya çıkıyor gibi görünmektedir. DM hastalarında diyabetik nöropati ile ilgili korneal konfokal mikroskopisi yeni bir yöntem olarak kullanılabilir ki bu yöntemle henüz büyük sinir lifleri etkilenmeden küçük sinir lifi hasarının tespit edilebiliyor olması bir avantaj da sağlayabilir. Diyabetik retinopati ile İVKM bulguları arasındaki ilişkiyi tam olarak anlamak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

#### Etik Standartlara Uygunluk

Kocaeli Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınmıştır (KÜ GOKAEK 14.01). Tüm prosedürler, kurumsal ve/veya ulusal araştırma komitesinin etik standartlarına ve 1964 Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

#### Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

#### Finansal Destek

Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

#### Yazar Katkısı

MT, ÖA, BYT: Çalışmanın tasarımı, veri toplanması ve analizi, kaynak taraması ve makale yazımı

#### Kaynaklar

1. Petropoulos IN, Ponirakis G, Ferdousi M, et al. Corneal confocal microscopy: a biomarker for diabetic peripheral neuropathy. *Clin Ther.* 2021;43(9):1457-1475. doi:10.1016/j.clinthera.2021.04.003
2. Celiker H, Ereku G, Turhan SA, et al. Early detection of neuropathy in patients with type 2 diabetes with or without microalbuminuria in the absence of peripheral neuropathy and retinopathy. *J Fr Ophtalmol.* 2021;44(4):485-493. doi:10.1016/j.jfo.2020.09.027
3. Liao YJ, Lin SF, Lee IT. Scores of peripheral neuropathic pain predicting long-term mortality in patients with type 2 diabetes: A retrospective cohort study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:969149. doi:10.3389/fendo.2022.969149
4. Tavakoli M, Kallinikos PA, Efron N, Boulton AJ, Malik RA. Corneal sensitivity is reduced and relates to the severity of neuropathy in patients with diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30(7):1895-1897. doi:10.2337/dc07-0175
5. Sumner CJ, Sheth S, Griffin JW, Cornblath DR, Polydefkis M. The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurology.* 2003;60(1):108-111. doi:10.1212/wnl.60.1.108
6. Tavakoli M, Petropoulos IN, Malik RA. Assessing corneal nerve structure and function in diabetic neuropathy. *Clin Exp Optom.* 2012;95(3):338-347. doi:10.1111/j.1444-0938.2012.00743.x
7. Ziegler D, Papanas N, Zhivov A, et al. Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes.* 2014;63(7):2454-2463. doi:10.2337/db13-1819
8. Smith AG, Kim G, Porzio M, et al. Corneal confocal microscopy is efficient, well-tolerated, and reproducible. *J Peripher Nerv Syst.* 2013;18(1):54-58. doi:10.1111/jns5.12008
9. Alam U, Ponirakis G, Asghar O, et al. Corneal confocal microscopy identifies people with type 1 diabetes with more rapid corneal nerve fibre loss and progression of neuropathy. *J Clin Med.* 2022;11(8):2249. doi:10.3390/jcm11082249
10. Breiner A, Lovblom LE, Perkins BA, Bril V. Does the prevailing hypothesis that small-fiber dysfunction precedes large-fiber dysfunction apply to type 1 diabetic patients? *Diabetes Care.* 2014;37(5):1418-1424. doi:10.2337/dc13-2005
11. Divisova S, Vlckova E, Hnojčikova M, et al. Prediabetes/early diabetes-associated neuropathy predominantly involves sensory small fibres. *J Peripher Nerv Syst.* 2012;17(3):341-350. doi:10.1111/j.1529-8027.2012.00420.x
12. Løseth S, Stålberg E, Jorde R, Mellgren SI. Early diabetic neuropathy: thermal thresholds and intraepidermal nerve fibre density in patients with normal nerve conduction studies. *J Neurol.* 2008;255(8):1197-1202. doi:10.1007/s00415-008-0872-0
13. Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the

- Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol*. 2010;17(7):903-e49. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03023.x
14. Petropoulos IN, Ponirakis G, Ferdousi M, et al. Corneal confocal microscopy: a biomarker for diabetic peripheral neuropathy. *Clin Ther*. 2021;43(9):1457-1475. doi:10.1016/j.clinthera.2021.04.003
  15. Alam U, Jeziorska M, Petropoulos IN, et al. Diagnostic utility of corneal confocal microscopy and intra-epidermal nerve fibre density in diabetic neuropathy. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180175. doi:10.1371/journal.pone.0180175
  16. Gad H, Al-Jarrah B, Saraswathi S, et al. Corneal confocal microscopy identifies a reduction in corneal keratocyte density and sub-basal nerves in children with type 1 diabetes mellitus. *Br J Ophthalmol*. 2022;106(10):1368-1372. doi:10.1136/bjophthalmol-2021-319057
  17. Ferdousi M, Romanchuk K, Mah JK, Virtanen H, Millar C, Malik RA, Pacaud D. Early corneal nerve fibre damage and increased Langerhans cell density in children with type 1 diabetes mellitus. *Sci Rep*. 2019;9(1):8758. doi: 10.1038/s41598-019-45116-z
  18. Tavakoli M, Quattrini C, Abbott C, et al. Corneal confocal microscopy: a novel noninvasive test to diagnose and stratify the severity of human diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 2010;33(8):1792-1797. doi:10.2337/dc10-0253
  19. Arcilla CK, Tadi P. Neuroanatomy, Unmyelinated Nerve Fibers. [Updated 2023 Jan 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554461/>
  20. Wang M, Zhang C, Zuo A, Li L, Chen L, Hou X. Diagnostic utility of corneal confocal microscopy in type 2 diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Investig*. 2021;12(4):574-582. doi: 10.1111/jdi.13381
  21. Bitirgen G, Ozkagnici A, Malik RA, Kerimoglu H. Corneal nerve fibre damage precedes diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2014;31(4):431-438. doi:10.1111/dme.12324