

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ



Studiul privind utilizarea microscopiei confocale de reflectanță cutanată în raport cu tulburările biochimice și metabolice la pacienții cu diabet zaharat cu și fără neuropatie periferică

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCATOR DE DOCTORAT:

PROF. UNIV. DR. IONESCU-TÎRGOVIȘTE CONSTANTIN

DOCTORAND:

GHIȚĂ (căs. ILIE) MIHAELA ADRIANA

2020

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

Lucrările științifice publicate

Lista cu abrevieri

Introducere

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

Capitolul 1. Neuropatia diabetică periferică

1.1. Date epidemiologice importante	1
1.2. Metode convenționale de diagnosticare a neuropatiei periferice	2
1.3. Metode morfologice, în curs de validare, pentru evaluarea neuropatiei periferice	5
1.4. Metode funcționale pentru evaluarea neuropatiei diabetice periferice	7
1.5. Noi biomarkeri serici în neuropatia diabetică periferică	10

Capitolul 2. Reacția inflamatorie cutanată indusă de capsaicină

2.1. Efectele capsaicinei la nivel cutanat	16
2.2. Capsaicina: structură, proprietăți fizico-chimice	17
2.3. Expresia și funcțiile receptorului pentru capsaicină	18
2.4. Inflamația neurogenică cutanată indusă de capsaicină	19
2.5. Efectele diabetului și ale neuropatiei periferice asupra reacției cutanate la capsaicină	21

Capitolul 3. Microscopia confocală de reflectanță *in vivo* la nivel cutanat

3.1. Avantajele microscopiei confocale de reflectanță <i>in vivo</i>	24
3.2. Principiile tehnice ale microscopiei confocale de reflectanță <i>in vivo</i>	25
3.3. Tegumentul normal în microscopia confocală de reflectanță <i>in vivo</i>	26
3.4. Aplicațiile clinice ale microscopiei confocale de reflectanță <i>in vivo</i>	28
3.5. Limitele actuale ale tehnicii și posibile soluții	30

II. CONTRIBUȚIILE PERSONALE

Capitolul 4. Raționament, Ipoteza de lucru, scopul și obiectivele generale	32
---	-----------

Capitolul 5. Metodologia generală a cercetării

5.1. Criteriile de etică	36
5.2. Subiecții incluși în studiu	36
5.3. Materiale și metode	
5.3.1. Preluarea datelor demografice, clinice și de laborator	37
5.3.2. Evaluarea neurologică	39
5.3.3. Microscopia confocală de reflectanță <i>in vivo</i>	41
5.4. Analiza statistică a datelor	47

Capitolul 6. Evaluarea componentelor microvasculare și inflamatorii din diverse afecțiuni cutanate cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* (studiul 1)

6.1. Afecțiuni inflamatorii cutanate	49
6.2. Amiloidoza cutanată	51
6.3. Cancere cutanate	52
	53

Capitolul 7. Explorarea funcționalității fibrelor nervoase periferice la pacienții cu diabet zaharat cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* (studiul 2)

7.1. Obiective specifice	55
7.2. Materiale și metode	55
7.3. Rezultate	60
7.4. Discuții	151
7.5. Concluzii	154

Capitolul 8. Investigarea micromorfologică a unor structuri nervoase cutanate cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* la pacienții cu diabet zaharat (studiul 3)

8.1. Obiective specifice	155
8.2. Materiale și metode	155

8.3. Rezultate	157
8.4. Discuții	169
8.5. Concluzii	172
Capitolul 9. Concluzii și contribuții personale	174
Bibliografie selectivă	179
ANEXE	237

Lucrările științifice publicate

Articole publicate in reviste ISI/BDI ([link PubMed](#);[link Google Scholar](#))

- Ionescu AM, **Ilie MA**, Chitu V, Razvan A, Lixandru D, Tanase C, Boda D, Caruntu C, Zurac S. In vivo Diagnosis of Primary Cutaneous Amyloidosis -the Role of Reflectance Confocal Microscopy. *Diagnostics (Basel)*. 2019 Jun 27;9(3). doi: 10.3390/diagnostics9030066. (IF=3.110) [*articol premiat UEFISCDI*]
- **Ilie MA**, Caruntu C, Tampa M, Georgescu SR, Matei C, Negrei C, Ion RM, Constantin C, Neagu M, Boda D. Capsaicin: Physicochemical properties, cutaneous reactions and potential applications in painful and inflammatory conditions. *Exp Ther Med*. 2019 Aug;18(2):916-925. doi: 10.3892/etm.2019.7513. (IF= 1.785)
- Ianosi SL, Batani A, **Ilie MA**, Tampa M, Georgescu SR, Zurac S, Boda D, Ianosi NG, Neagoe D, Calina D, Tutunaru C, Caruntu C. Non-invasive imaging techniques for the in vivo diagnosis of Bowen's disease: Three case reports. *Oncology letters* 2019:1-8. doi: 10.3892/ol.2019.10079. (IF= 2.311)
- **Ilie MA**, Caruntu C, Lupu M, Lixandru D, Georgescu SR, Bastian A, Constantin C, Neagu M, Zurac SA, Boda D. Current and future applications of confocal laser scanning microscopy imaging in skin oncology. *Oncology letters* 2019:1-10. doi: 10.3892/ol.2019.10066. (IF= 2.311)
- Ianoși SL, Forsea AM, Lupu M, **Ilie MA**, Zurac S, Boda D, Ianosi G, Neagoe D, Tutunaru C, Popa CM, Caruntu C. Role of modern imaging techniques for the in vivo diagnosis of lichen planus. *Exp Ther Med*. 2019 Feb;17(2):1052-1060. doi: 10.3892/etm.2018.6974. (IF= 1.785)
- **Ilie MA**, Caruntu C, Lixandru D, Tampa M, Georgescu SR, Constantin MM, Constantin C, Neagu M, Zurac SA, Boda D. In vivo confocal laser scanning microscopy imaging of skin inflammation: Clinical applications and research

directions. Exp Ther Med. 2019 Feb;17(2):1004-1011. doi: 10.3892/etm.2018.6981. (IF= 1.785)

- Iosif L, Lixandru D, Gaman L, **Ilie M**, Smeu B, Stefan DS, Petcu L, Picu A, Constantin A, Ionescu-Tirgoviste C, Guja C, Copaescu C, Stoian I. OXIDATIVE STRESS PROFILE AND TYPE 2 DIABETES REMISSION AT 6 MONTHS AFTER SLEEVE GASTRECTOMY VERSUS CONSERVATORY TREATMENT. Farmacia. 2019;67(1):99-105. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2019.1.13>. (IF= 1.607)
- Solomon I, Voiculescu VM, Caruntu C, Lupu M, Popa A, **Ilie MA**, Albulescu R, Caruntu A, Tanase C, Constantin C, Neagu M, Boda D. Neuroendocrine Factors and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: An Affair to Remember. Dis Markers. 2018 May 8;2018:9787831. doi: 10.1155/2018/9787831. (IF= 2.738) [*articol premiat UEFISCDI*]
- Batani A, Brănișteanu DE, **Ilie MA**, Boda D, Ianosi S, Ianosi G, Caruntu C. Assessment of dermal papillary and microvascular parameters in psoriasis vulgaris using in vivo reflectance confocal microscopy. Exp Ther Med. 2018 Feb;15(2):1241-1246. doi: 10.3892/etm.2017.5542. (IF= 1.785)
- Georgescu SR, Sârbu MI, Matei C, **Ilie MA**, Caruntu C, Constantin C, Neagu M, Tampa M. Capsaicin: Friend or Foe in Skin Cancer and Other Related Malignancies? Nutrients. 2017 Dec 16;9(12). doi: 10.3390/nu9121365. (IF= 4.546) [*articol premiat UEFISCDI*]
- **Ghita MA**, Caruntu C, Rosca AE, Caruntu A, Moraru L, Constantin C, Neagu M, Boda D. Real-Time Investigation of Skin Blood Flow Changes Induced by Topical Capsaicin. Acta Dermatovenerol Croat. 2017 Oct;25(3):223-227. (IF= 0.855)
- Lupu M, Caruntu A, Caruntu C, Papagheorghe LML, **Ilie MA**, Voiculescu V, Boda D, Carolina C, Tanase C, Sifaki M, Drakoulis N, Mamoulakis C, Tzanakakis G, Neagu M, Spandidos DA, Izotov BN, Tsatsakis AM. Neuroendocrine factors: The missing

link in non-melanoma skin cancer (Review). *Oncol Rep.* 2017 Jul 13. doi: 10.3892/or.2017.5817.(IF= 3.417)

- Kobylinska L, **Ghita MA**, Caruntu C, Gabreanu G, Tataru CP, Badescu SV, Geicu O, Neagu M, Constantin C, Dobrescu I, Zagrean L. PRELIMINARY INSIGHTS IN OXYTOCIN ASSOCIATION WITH THE ONSET OF DIABETIC NEUROPATHY. *Acta Endocrinologica (1841-0987)*. 2017 Apr 1;13(2).(IF= 0.449)
- **Ghita MA**, Caruntu C, Lixandru D, Pitea A, Batani A, Boda D. The Quest for Novel Biomarkers in Early Diagnosis of Diabetic Neuropathy. *Current Proteomics*. 2017; 2017:14. doi: 10.2174/1570164614666161228122259. (IF=0.757)
- Lixandru D, Moraru L, Alexandru P, Stoian I, Rosca A, **Ghita M**, Caruntu C, Caruntu A, Tirgoviste CI, Guja C. Implications of Antioxidant Enzyme Paraoxonase 2 in Insulin Synthesis and Secretion. *REVISTA DE CHIMIE*. 2016 Nov 1;67(11):2332-6. (IF= 1.755)
- **Ghita MA**, Caruntu C, Rosca AE, Kaleshi H, Caruntu A, Moraru L, Docea AO, Zurac S, Boda D, Neagu M, Spandidos DA, Tsatsakis AM. Reflectance confocal microscopy and dermoscopy for in vivo, non-invasive skin imaging of superficial basal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2016 May;11(5):3019-3024. doi: 10.3892/ol.2016.4354. (IF=1.554).
- Caruntu C, Negrei C, **Ghita MA**, Caruntu A, Badarau AI, Buraga I, Boda D. Capsaicin, a hot topic in skin pharmacology and physiology. *Farmacia*. 2014;63(4):487-491 (IF= 1.607).

Capitole de carte

- **Ilie MA**, Boda D, Zurac SA, Caruntu C. Microscopia confocala in vivo – o fereastră deschisă spre microstructura pielii. In: *Patologia dermatologica la granița dintre specialități; sub redacția Conf. Dr. Daciana Elena*, Editura Junimea, Iași 2017. ISBN: 978-973-37-2013-3

- Batani A, **Ghita MA**, Vilcu M, Boda D, Caruntu C. Diabetic neuropathy in dermatology. In: Diabetic Neuropathy. Coord. Aurel F. Marin. Viata Medicala. Bucharest 2016; Supl (48-49) (ISBN 978-606-94161-0-5).

Rezumate publicate în volumele conferințelor naționale/ internaționale

- **Ilie MA**, Tebeica T, Coman C, Boda D, Raducan S, Caruntu C, “In vivo reflectance confocal microscopy features of primary cutaneous follicle center cell lymphoma”, poster la 24th World Congress of Dermatology, 10-15 iunie 2019, Milano, Italia, abstract pe USB, fara ISBN;
- **Ilie MA**, Cobzaru A, Boda D, Lixandru D, Ionescu-Targoviste C, Caruntu C, “Clinical implications of neurogenic inflammation”, prezentare orala la The 9th Conference of the National Neuroscience Society of Romania, 18-20 octombrie 2018, Bucuresti, Romania, abstract O28 publicat in Physiology ISSN 1223-2076; 2018 1 (Supplement):25.
- **Ilie MA**, Cobzaru AM, Boda D, Lixandru D, Ionescu-Tirgoviste C, Caruntu Constantin, “In vivo reflectance confocal microscopy for the investigation of cutaneous microvascular response to topical capsaicin in diabetes mellitus”, poster la World Congress of Confocal Microscopy, 18-20 octombrie 2019, Roma, Italia, abstract pe USB,fara ISBN.
- Caruntu C, **Ilie MA**, Batani A, Zurac S, Ianosi S, Branisteanu DE, Boda D. „Evaluarea neinvaziva a leziunilor de psoriazis prin microscopia confocala de reflectanta”. Prezentare invitata la Primul Congres al Asociatiei Române de Imuno- Dermatologie, Bucuresti, 13-14 Octombrie 2017. Publicat in CONGRUENTE ÎN IMUNODERMATOLOGIE. Bucuresti, Editura ALL, 2017 pag 32, ISBN 978-606-587-508-1.
- **Ilie MA**, Caruntu C, Chitu V, Zurac S, Batani A, Boda D, “Reflectance confocal microscopy for the in vivo diagnosis of primary cutaneous amyloidosis”, poster P1008

la 26th EADV Congress, 13-17 septembrie 2017, Geneva , abstract pe USB, ISBN: 978-88-942552-1-8;

Proiecte (membru in echipa – cercetator la doctorat)

- Proiect PN-III-P1-1.PCCDI-2017-0341: “Platforma multidisciplinara pentru imbunatatirea capacitatii institutionale regionale in dermatooncologie si dermatopatologiei oncologice – PATHDERM” (1.01.2020-31.10.2020)
- Proiect PN-III-P2-2.1-BG-2016-0443: “Implementarea interdisciplinara aplicativa si evaluarea toxicologica ale unor noi formulari farmaceutice ale capsaicinei” (19.12.2016-01.01.2018)
- Proiect POSDRU/187/1.5/S/155420: “Promovarea stiintei si calitatii in cercetare prin burse doctorale (PROSCIENCE)” (15.07.2015-31.12.2015)
- Proiect PN-II-PT-PCCA-2013-4-2154: „Dezvoltarea unui protocol de selecție pentru chirurgia metabolică în urma evaluării impactului acesteia asupra remisiei diabetului zaharat de tip 2 la pacienții cu obezitate" (05.10.2015-31.12.2016)

Problema fundamentală

Federația Internațională de Diabet estimează că aproximativ 425 milioane de oameni suferă de diabet zaharat la nivel mondial [1], putând fi considerată epidemia metabolică globală a secolului XXI [2]. Dintre complicațiile cronice ale diabetului zaharat, neuropatia diabetică este cea mai frecventă [3, 4], putând afecta până la 50-90% dintre pacienții cu diabet zaharat, valorile diferite ale prevalenței datorându-se metodelor diferite de stabilire a afectării fibrelor nervoase [5]. Morbiditatea asociată neuropatiei diabetice este mare, acești pacienți având pe lângă simptomatologia neuropată [6] și un risc crescut de apariție a ulcerelor plantare și a osteoatrofiei Charcot în cazul neuropatiei periferice [7]. În plus, are cea mai mare contribuție la necesitatea amputațiilor de membru inferior [8] și este un factor predictor important atât a mortalității de orice cauză, cât și a mortalității asociate diabetului la acești pacienți [9]. Costurile anuale asociate neuropatiei diabetice și a complicațiilor sale în SUA sunt evaluate la 13 miliarde \$, fiind aproape duble față de costurile îngrijirii pacienților diabetici [10]. De neglijat nu sunt nici costurile la nivel de individ în termeni de sănătate fizică, psihică și calitatea vieții, precum și la nivel de societate prin scăderea productivității din cauza dizabilității [11]. Situația devine și mai îngrijorătoare având în vedere predicția pentru anul 2050 conform căreia 1/3 din populație va dezvolta diabet zaharat, iar 1/2 dintre aceștia vor avea și neuropatie [12].

Cu toate acestea, diagnosticarea neuropatiei diabetice în stadii incipiente, pentru a preveni apariția complicațiilor acesteia, reprezintă în continuare o adevărată provocare, în ciuda diversității și complexității metodelor existente. Deși evaluarea electrofiziologică (studiul conducerii nervoase) este considerată ca fiind cea mai sensibilă, reproductibilă și obiectivă metodă de caracterizare și cuantificare a neuropatiei diabetice [13], ea evaluează doar fibrele mielinizate cu diametru mare, care reprezintă aproximativ 10% dintre nervii periferici [14]. Fibrele nervoase cu diametru mic (subțiri), reprezentate de fibrele mielinizate A-delta și nemielinizate de tip C constituie majoritatea fibrelor nervoase periferice și sunt considerate a fi primele care suferă modificări în neuropatia diabetică periferică [15]. Acestea au semnificație fiziopatologică directă în generarea semnalelor nociceptive, determinând atât durerea neuropată [16], cât și alterarea răspunsului vasodilatator indus de presiune [17], predispunând la apariția ulcerului piciorului diabetic. Reducerea densității fibrelor nervoase

intraepidermice a fost evidențiată atât la pacienți cu diabet zaharat de tip 1 și 2 [18-20], cât și la subiecți cu toleranța alterată la glucoză, care s-a îmbunătățit după schimbarea stilului de viață [21]. În plus, s-a observat și reducerea expresiei neuropeptidelor substanța P (SP) și peptidul asociat genei calcitoninei (CGRP), predominant la nivelul fibrelor nervoase senzoriale cu diametru mic, precum și a peptidului vasoactiv intestinal (VIP) și a neuropeptidului Y (NPY), predominant la nivelul fibrelor nervoase autonome [22, 23]. La pacienții diabetici au fost evidențiate de asemenea mai puține fibre nervoase pozitive pentru TRPV1 la nivelul tegumentului, dar și o reducere a expresiei TRPV1 în fibrele nervoase restante. TRPV1 este un canal cationic neselectiv care integrează variați stimuli nocivi, fiind implicat în transmiterea și modularea durerii, printre agoniștii săi numărându-se și capsaicina, extractul picant din ardeiul iute [24]. Este exprimat predominant la nivelul fibrelor nervoase senzoriale subțiri [24], iar reducerea imunoreactivității pentru TRPV1 la diabetici pare să preceadă reducerea densității acestor fibre nervoase [25]. Cu toate că evaluarea histologică a inervației cutanate prin caracterizarea morfologiei fibrelor nervoase, precum și a densității lor are un rol important în identificarea neuropatiei periferice diabetice în stadii incipiente, aceasta nu oferă informații referitoare la funcționalitatea fibrelor nervoase [26] și este o procedură invazivă, care necesită pentru examinare un anatomopatolog cu experiență [27]. O abordare dinamică, care oferă informații privind **funcționalitatea fibrelor nervoase** subțiri nociceptoare cuprinde **evaluarea reactivității neurovasculare cutanate** la stimuli aplicați local precum aceticolină [28], căldura [29, 30], capsaicină [26, 31, 32] sau în cadrul reflexului de axon [33, 34]. Alterarea răspunsului vasodilatator la diferiți stimuli topici, evidențiată în cele mai multe cazuri cu ajutorul fluximetriei laser-Doppler, apare în stadiile inițiale ale neuropatiei diabetice, când testarea senzorială cantitativă este nemodificată, sugerând faptul că alterarea reactivității neurovasculare poate reprezenta un marker precoce al disfuncției fibrelor nervoase periferice [26, 28].

Ipoteza de cercetare

Un studiu recent realizat de către grupul nostru de cercetare (Laboratorul de Cercetare în Dermatologie din cadrul Institutului Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice „Prof. N Paulescu” (sediul de str. Grigore Manolescu nr. 22-24), a demonstrat posibilitatea utilizării microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* (*in vivo* RCM) pentru cuantificarea răspunsului vasodilatator în cadrul inflamației neurogenice cutanate induse de capsaicină la subiecți umani sănătoși, prin evaluarea microvascularizației cutanate de la nivelul joncțiunii dermo-epidermice [32]. Capsaicina, prin activarea receptorului TRPV1 de la nivelul fibrelor nervoase subțiri cutanate [24] induce un răspuns ortodromic, cu apariția senzației de durere cu caracter de arsură, precum și a unui răspuns antidromic, cu eliberarea de neuropeptide, în principal SP, CGRP [35] și apariția unui răspuns inflamator localizat [36]. Rezultatele obținute încurajează dezvoltarea unei metode care să măsoare **reactivitatea neurovasculară ca răspuns la aplicarea cutanată de capsaicină în cazul pacienților diabetici, pentru evaluarea funcționalității fibrelor nervoase periferice și diagnosticarea neuropatiei diabetice în stadii subclinice** [26, 31, 37]. Microscopia confocală de reflectanță *in vivo* permite investigarea non-invazivă a microvascularizației cutanate atât din punct de vedere micromorfologic, cu o rezoluție înaltă, apropiată de cea a histologiei clasice, cât și funcțional, permițând evaluarea în dinamică a răspunsului vasodilatator și a fluxului sanguin cutanat ca răspuns la diferiți stimuli topici [26, 31]. În plus, cu ajutorul acestei tehnici imagistice pot fi analizați **corpusulii Meissner în pielea glabră a pacienților cu diabet**, sugerând posibilitatea folosirii acestui parametru în cuantificarea neuropatiei diabetice [26, 38]. Caracterul non-invaziv al examinării, precum și posibilitatea investigării *in vivo* și în timp real a structurilor tegumentului, oferă posibilitatea repetării analizării la diferite intervale de timp a aceleiași regiuni cutanate, pentru monitorizarea progresiei bolii și a răspunsului la tratament.

Scopul si obiectivele generale

În cadrul acestei teze de doctorat, ne-am propus dezvoltarea unei metode de evaluare micromorfologică și funcțională a structurilor nervoase cutanate, utilă pentru diagnosticarea (în stadii subclinice) și monitorizarea neuropatiei periferice la pacienții cu diabet zaharat.

Pentru îndeplinirea acestui scop, au fost stabilite următoarele obiective generale:

1. Evaluarea componentelor microvasculare și inflamatorii din diverse afecțiuni cutanate cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță *in vivo*
2. Explorarea funcționalității fibrelor nervoase periferice la pacienții cu diabet zaharat cu ajutorul microscopiei confocale *in vivo* prin evaluarea răspunsului neurovascular cutanat la capsaicină
3. Investigarea micromorfologică a unor structuri nervoase cutanate cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* la pacienții cu diabet zaharat

Sinteza ideilor principale

În Partea Generală a tezei, structurată în 3 capitole, am prezentat stadiul actual al cunoașterii privind diagnosticarea neuropatiei diabetice periferice, reacția inflamatorie cutanată indusă de capsaicină și microscopia confocală de reflectanță *in vivo*. În primul capitol, am trecut în revistă metodele convenționale, morfologice și funcționale de diagnosticare a neuropatiei diabetice periferice, punând accent pe avantajele și dezavantajele fiecărei metode. În al doilea capitol am prezentat componentele inflamației neurogenice induse de capsaicină și efectele diabetului și ale neuropatiei periferice asupra reacției cutanate la capsaicină, subliniind utilitatea acestui model de răspuns neurovascular pentru evaluarea funcționalității fibrelor nervoase periferice. În al treilea capitol, am descris microscopia confocală de reflectanță *in vivo*, cu accent pe avantajele, principiile tehnice și aplicațiile clinice ale examinării cutanate folosind această tehnică imagistică nouă. Microscopia confocală de reflectanță *in vivo* (*in vivo* RCM) permite evaluarea non-invazivă și în timp real a microvascularizației cutanate, cu o rezoluție mare, qvasi-microscopică. De asemenea, caracterul non-invaziv al examinării oferă posibilitatea examinării aceleiași zone cutanate la

diferite intervale de timp pentru studierea în dinamică a proceselor fiziologice sau patologice cu localizare cutanată. Grupul nostru de cercetare a utilizat pentru prima dată *in vivo* RCM pentru evidențierea și cuantificarea modificărilor capilarelor papilelor dermice și ale fluxului sanguin cutanat în cadrul inflamației neurogenice cutanate la subiecți sănătoși.

În Partea de Contribuții Personale a tezei, am investigat cu ajutorul *in vivo* RCM modificările microvascularizației cutanate în diverse afecțiuni tumorale/inflamatorii (studiul 1) și în cadrul reacției inflamatorii neurogenice induse de capsaicină (răspusul neurovascular cutanat) pentru evaluarea funcționalității fibrelor nervoase periferice la pacienții cu diabet zaharat cu și fără modificări ale conducerii nervoase (studiul 2). În cadrul unui studiu mai mic, realizat pe pacienți proveniți din studiul anterior, am investigat din punct de vedere micromorfologic structuri nervoase cutanate (corpusul Meissner) cu ajutorul *in vivo* RCM la pacienții cu diabet zaharat (studiul 3). Rezultatele obținute sunt promițătoare și încurajează utilizarea *in vivo* RCM pentru evaluarea funcționalității fibrelor nervoase periferice și a morfologiei și densității corpusculilor Meissner în diabetul zaharat, pentru diagnosticarea neuropatiei diabetice periferice înainte de apariția modificărilor electrofiziologice. În plus, caracterul non-invaziv ale examinării oferă posibilitatea repetării analizării la diferite intervale de timp a aceleiași regiuni cutanate, pentru monitorizarea progresiei bolii și a răspunsului la tratamentul neuroprotector.

Evaluarea componentelor microvasculare și inflamatorii din diverse afecțiuni cutanate cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* (studiul 1)

Inflamația neurogenică este implicată în numeroase procese fiziologice și patologice cu localizare cutanată, subliniind interacțiunile complexe dintre piele și sistemul nervos [39]. Evaluarea componentelor inflamației cutanate (microvascularizația cutanată, fluxul sanguin, celulele inflamatorii) prezintă un potențial deosebit atât pentru elucidarea căilor patogenice din afecțiunile inflamatorii cutanate, dar și în cadrul studiilor experimentale și funcționale care implică pielea. Dintre tehnicile imagistice non-invazive existente, microscopia confocală

de reflectanță *in vivo* (*in vivo* RCM) prezintă cel mai mare potențial în acest sens, deoarece permite caracterizarea structurilor cutanate atât din punct de vedere morfologic, cu o rezoluție mare, apropiată de cea a microscopiei clasice, cât și din punct de vedere funcțional, prin evaluarea în dinamică a răspunsului tegumentului la diferiți stimuli. *In vivo* RCM este o metoda excelentă pentru investigarea capilarelor papilelor dermice localizate la nivelul joncțiunii dermoepidermice și a modificărilor de la acest nivel prezente în inflamația cutanată [40].

Prin urmare, în cadrul cercetărilor doctorale, am investigat modificările ce apar la nivelul joncțiunii dermoepidermice (cu accent pe microvascularizația cutanată, celulele inflamatorii) în anumite condiții patologice și experimentale cu ajutorul *in vivo* RCM.

În secțiunile optice orizontale din *in vivo* RCM preluate de la nivelul joncțiunii dermoepidermice (JDE) din pielea normală (**Fig. 6.1.A**), celulele stratului bazal al epidermului formează cercuri strălucitoare, înconjurată de stratul spinos cu aspect de „fagure de miere”. Zonele întunecate din centrul papilelor dermice corespund papilelor dermice și au în centru ansele capilare, ce apar sub forma unor găuri negre. Elementele figurate ale sângelui apar sub forma unor elemente strălucitoare în lumenul capilarelor, iar fluxul sanguin poate fi observat, în timp real, în înregistrările video.

Majoritatea **afecțiunilor inflamatorii benigne** sunt limitate la nivelul epidermului și dermului superficial, iar investigarea acestora la nivelul JDE cu ajutorul *in vivo* RCM aduce informații esențiale pentru diagnosticul lor histomorfologic (**Fig. 6.1**). În leziunile de psoriazis vulgar, la acest nivel pot fi observate creșterea numărului și diametrului papilelor dermice, ce conțin anse capilare dilatate (**Fig. 6.1.B**) [41, 42]. Pornind de la aceste trăsături, grupul nostru de cercetare a identificat o metodă de evaluare obiectivă a leziunilor, ce ar putea fi aplicată în studiile clinice privind eficacitatea terapiilor biologice în psoriazis [41]. Din cauza infiltratului inflamator de la nivelul JDE și a degenerescentei vacuolare, cercurile strălucitoare corespunzătoare stratului bazal al epidermului sunt înlocuite cu structuri șterse, hiporefractile în lichenul plan (**Fig. 6.1.C**) [43, 44]. În leziunile de lupus eritematos discoid, pe lângă dispariția inelelor strălucitoare ce înconjoară papilele dermice, infiltratul inflamator se localizează și perianexial, în jurul foliculilor piloși (**Fig. 6.1.D**) [45].

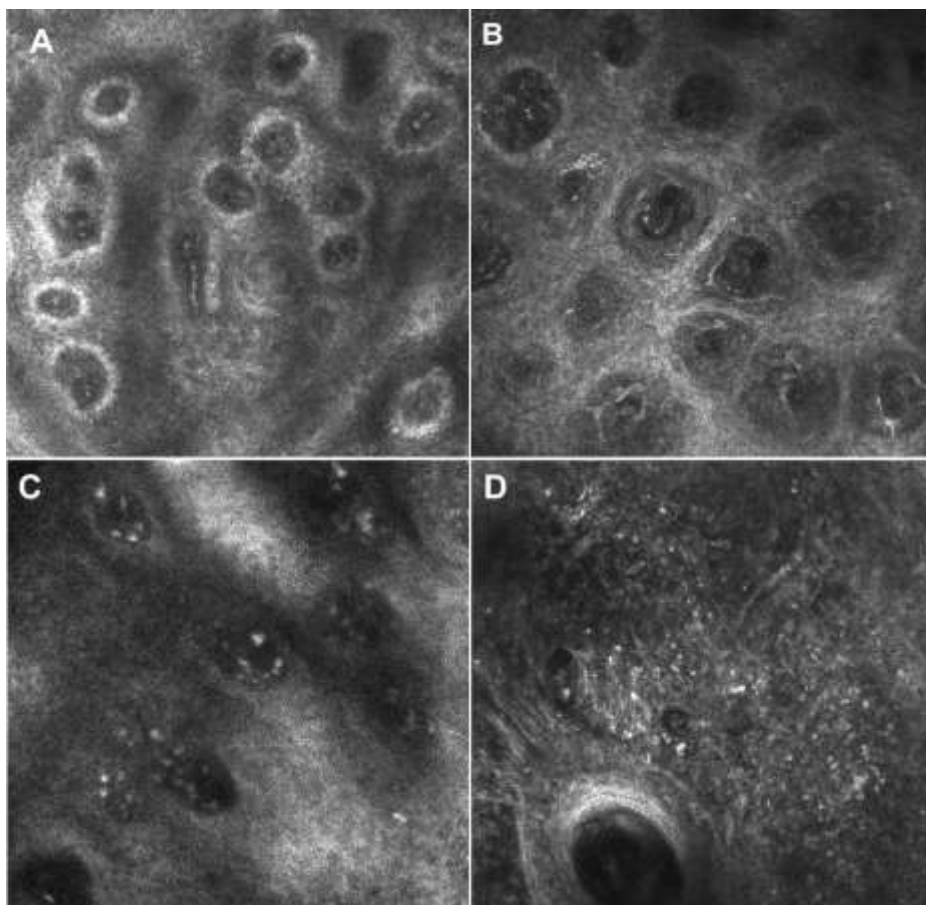


Fig. 6.1. Imagini de in vivo RCM (0.5x 0.5 mm) preluate de la nivelul JDE din (A) pielea normală și leziunile cutanate de (B) psoriazis, (C) lichen plan, (D) lupus eritematos discoid.

Joncțiunea dermoepidermică poate reprezenta și locul depozitării de proteine anormale, cum se întâmplă în **amiloidoza cutanată** [46]. În cadrul studiilor doctorale, am contribuit cu a doua publicație din literatura de specialitate privind rolul *in vivo* RCM în diagnosticarea non-invazivă a amiloidozei cutanate, evidențiind utilitatea clinică a tehnicii în cazul pacienților cu afecțiuni (ex:diabetul zaharat) ce pot îngreuna vindecarea după prelevarea biopsiei cutanate [46]. Depozitele de amiloid apar sub forma unor structuri hiper-refractile cu diferite forme (punctiforme, coliforme, aglomerari) în interiorul papilelor dermice, iar celulele bazale sunt strălucitoare datorită conținutului crescut de melanină (**Fig. 6.2**).

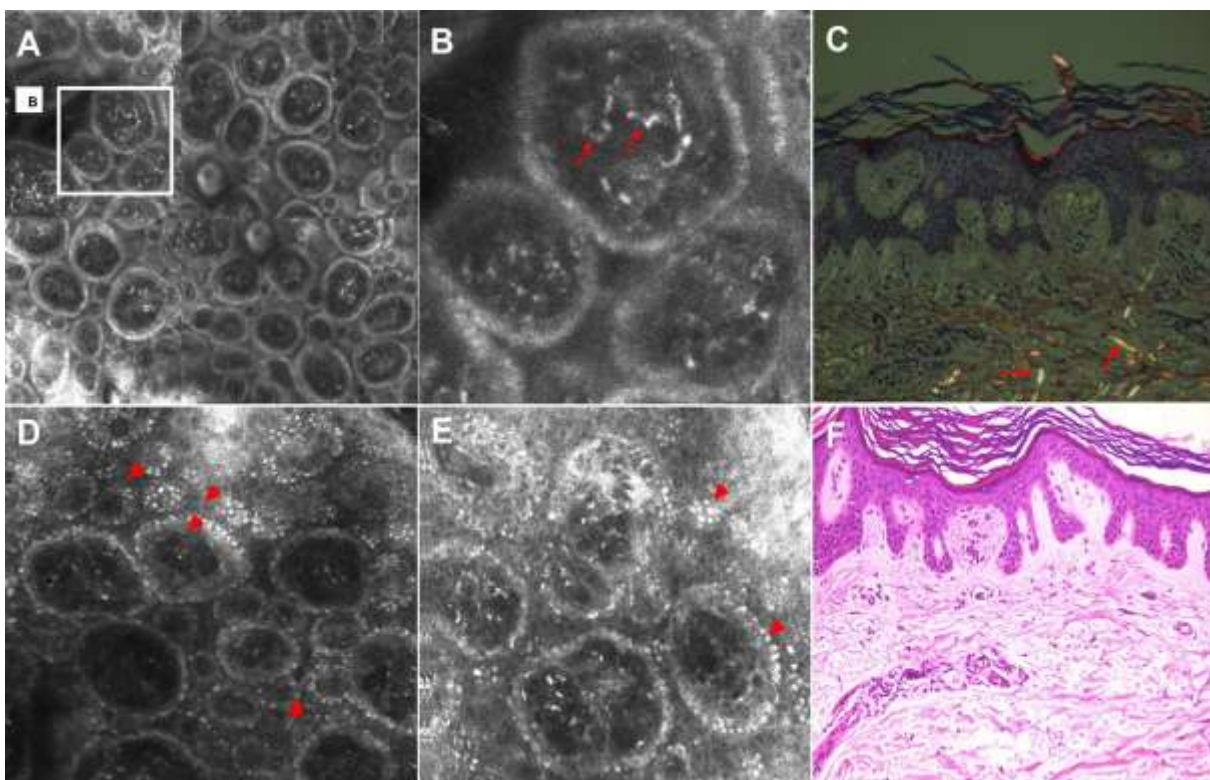


Fig. 6.2. Corelarea imaginilor de in vivo RCM și histopatologie în amiloidoza cutanată: (A) Mozaic obținut cu in vivo RCM (1.5x1 mm) și (B) imagine în detaliu (0.25x0.25 mm) de la nivelul JDE ce arată depozitele de amiloid ce apar ca structuri hiper-refractile (→) în interiorul papilelor dermice; (C) Imagine histopatologică (X20, roșu de congo); ce arată depozitele de amilod birefringente, verzui în lumina polarizată; Imagini de in vivo RCM preluate de la nivelul JDE (D)(0.5x0.5 mm) și (E)(0.4x0.4 mm) ce arată stratul bazal al epidermului, strălucitor, cu depozite crescute de melanină (vârf de săgeată); (F) Imagine histopatologică (X20, HE) ce arată depozitele de melanină din stratul bazal al epidermului.

Inflamația cronică cutanată, prin intermediul citokinelor și chemokinelor proinflamatorii, pare să favorizeze transformarea malignă și progresia cancerelor de piele [47], iar inflamația asociată tumorilor poate promova proliferarea și supraviețuirea celulelor maligne [47, 48]. *In vivo* RCM permite evaluarea non-invazivă, în dinamică și în timp real a componentelor vasculare și inflamatorii asociate tumorilor cutanate [49]. Din acest motiv, o parte a cercetării doctorale a fost îndreptată către studierea rolului in vivo RCM în evaluarea celor mai frecvente **cancere de piele** [49, 50].

În plus, am descris pentru prima oară aspectul leziunilor de limfom foliculocentric cutanat primar, o formă de limfom cutanat cu celule B, în microscopia confocală in vivo (**Fig. 6.3**). Trăsăturile observate in vivo includ mase tumorale hiper-refractile, rotunde, celule strălucitoare dispersate la nivelul dermului și agregate de celule strălucitoare, de mici dimensiuni la periferia maselor tumorale [49].

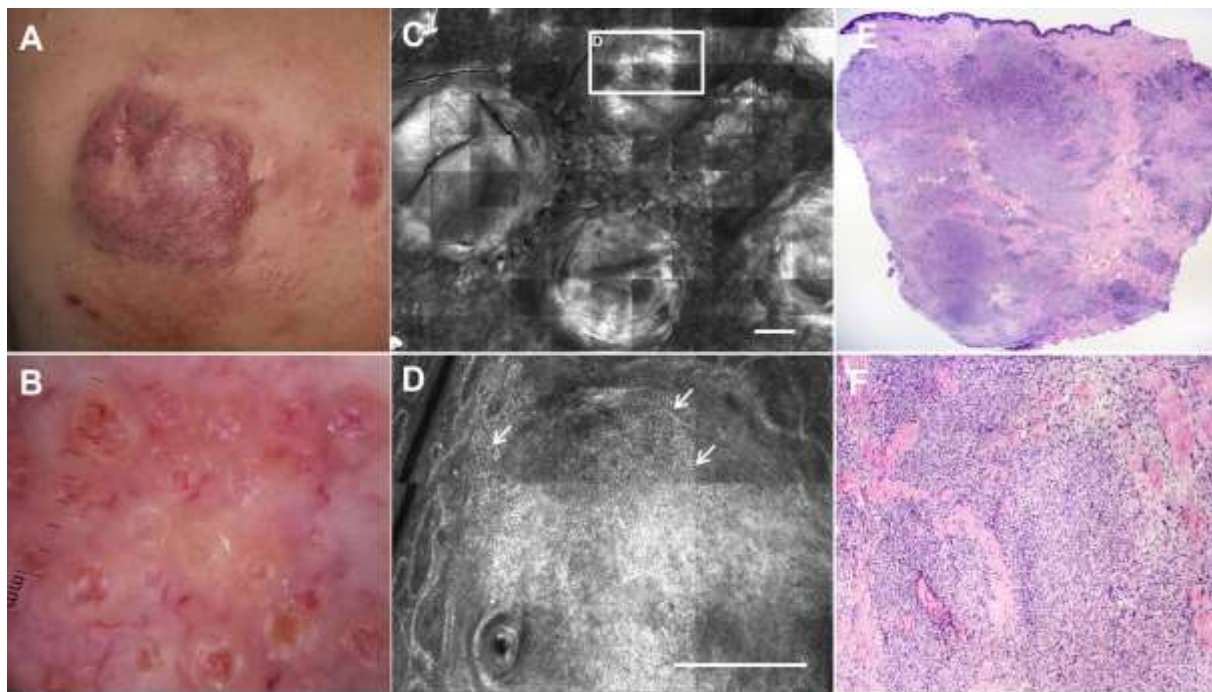


Fig. 6.3. Corelarea imaginilor clinice, dermatoscopice, de in vivo RCM și histopatologice în limfomul foliculocentric cutanat primar. (A) Imaginea clinică: placa eritemo-violacee cu suprafața mamilată, strălucitoare; (B) Dermatoscopia: fond roz-somon, vase proeminente cu aspect serpiginos, arii rotunde alb-galbui; Imagini de in vivo RCM ce arată: (C) mase tumorale, hiper-refractile, rotunde, bine delimitate și (D) agregate alcătuite din celule mici, strălucitoare (→) localizate la periferia unei mase tumorale (scale bar = 500 μ m); Histologia: (E) (20X, HE) infiltrat limfoid difuz la nivelul dermlui și țesutului subcutanat; F) (100X, HE) aglomerare de centrocite, centroblaste și limfocite de mici dimensiuni.

Explorarea funcționalității fibrelor nervoase periferice la pacienții cu diabet zaharat cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță *in vivo*

(studiul 2)

Obiective specifice

- a) evaluarea modificărilor microvascularizației cutanate în cadrul reacției inflamatorii neurogenice induse de capsaicină (răspunsul neurovascular cutanat) cu ajutorul *in vivo* RCM la subiecți sănătoși și pacienți cu diabet zaharat cu și fără neuropatie diabetică periferică
- b) evaluarea influenței diabetului zaharat și a neuropatiei periferice asupra răspunsului neurovascular cutanat după aplicarea topică a capsaicinei
- c) corelarea răspunsului neurovascular cutanat indus de capsaicină la pacienții cu diabet zaharat cu afectarea fibrelor nervoase periferice (amplitudine și viteza de conducere nervoasă, punctaj chestionar MNSI, prezența tulburărilor de sensibilitate) și alți parametri din studiu
- d) stabilirea capacității de predicție a neuropatiei diabetice periferice (în stadiu sublinic) utilizând evaluarea răspunsului neurovascular cutanat indus de capsaicină cu ajutorul *in vivo* RCM

Materiale și metode

28 pacienți cu diabet zaharat de ambele sexe și 17 subiecți sănătoși au fost incluși în acest studiu experimental conform criteriilor de includere în Lotul Diabet, respectiv Lotul Control și criteriilor de excludere prezentate în Metodologia generală a cercetării. Pe scurt, Lotul Diabet a fost alcătuit din pacienți cu diabet zaharat de tip 1 (n=14) sau 2 (n=14), conform criteriilor Asociației Americane de Diabet, Lotul Control din subiecți sănătoși, fără diabet zaharat sau neuropatie periferică și din ambele loturi au fost excluși subiecții cu afecțiuni care se asociază cu neuropatie periferică, altele decât diabetul zaharat. Toți subiecții incluși în studiu au parcurs cele 3 etape ale diagramei studiului (**Tabel V.1**).

Tabel V.1. Diagrama studiului

Etapă 1 studiu	Etapă 2 studiu	Etapă 3 studiu
• Obținere consimțământ informat • Preluare date antropometrice, clinice, de laborator • Verificarea respectării criteriilor de includere și excludere Locație: Centrul de Cercetare al INDNBM „Prof. N Paulescu” (sediul de str. Caragiale nr.12)	• MNSI • Examen clinic neurologic (sensibilități, forța musculară) • Testare electrofiziologică (studii de conducere nervoasă) Locație: Spitalul Universitar de Urgență din București	• Microscopia confocală de reflectanță in vivo pentru evaluarea: - Răspunsului neurovascular cutanat (față dorsală mână) - Densității corpusculilor Meissner (față palmară) Locație: Centrul de Cercetare al INDNBM „Prof. N Paulescu” (sediul de str. Grigore Manolescu 22-24)

MNSI: Instrumentul Michigan de screening al neuropatiei

După ce au semnat Consimțământul Informat, au fost înregistrate date referitoare la profilurile demografice și clinice ale subiecților incluși în studiu (vârstă, sex, înălțime, greutate, statutul de fumător/nefumător, data diagnosticării diabetului, tipul de diabet, antecedente personale patologice, tratament) și au fost recoltate probe de sânge venos în vacutainere fără anticoagulant pentru determinarea parametrilor biochimici și în vacutainere cu EDTA pentru determinarea parametrilor de stres oxidativ. Parametrii biochimici determinați din ser au fost: glicemia bazală (mg/dl), HbA1c (%), colesterolul total (mg/dl), trigliceride (mg/dl), GPT (U/L), GOT (U/L), GGT (U/L), creatinina serică (mg/dl), ureea serică (mg/dl), acidul uric seric (mg/dl), albumina serică (g/dl), proteine totale serice (g/dl) și HDL- colesterolul (md/dl). Valoarea LDL-colesterolului a fost calculată cu formula Friedewald [51]. Pentru determinarea parametrilor de stres oxidativ, a fost cuantificată producția de radicali liberi din cadrul puseului respirator în momentul emisiei maxime de chemiluminiscență și exprimată sub forma valorii maxime (RB LM/PMA (Peak), RB LG/PMA (Peak), RB LM/OZ (Peak), RB LG/OZ (Peak)) și a ariei de sub curba (RB LM/PMA (AUC), RB LG/PMA (AUC), RB LM/OZ (AUC)).

În următoarea etapă a studiului, subiecții din Lotul Diabet au fost evaluați din punct de vedere neurologic prin intermediul chestionarului MNSI, a examinării clinice a sensibilităților, reflexelor și forței musculare și testării neurofiziologice (studierea conducerii nervoase). În funcție de valorile obținute la testarea electrofiziologică (amplitudinea și viteza de conducere nervoasă), pacienții din Lotul Diabet a fost distribuiți în: **Lotul Diabet fără Neuropatie** (DFN) și **Lotul Diabet cu Neuropatie** (DCN). Ulterior, au fost evaluate microvascularizația cutanată de la nivelul feței dorsale a mâinii în cadrul reacției inflamatorii induse de capsaicină (protocol detaliat mai jos) și densitatea corpusculilor Meissner de pe fața palmară (protocol detaliat în capitolul 8) cu microscopul confocal de reflectanță in vivo.

Evaluarea microvascularizației cutanate în cadrul reacției inflamatorii neurogenice induse de capsaicină (răspusul neurovascular cutanat) cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță in vivo s-a realizat în Laboratorul de Cercetare în Dermatologie din cadrul Institutului Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice „Prof. N Paulescu” (sediul de str. Grigore Manolescu nr.22-24), conform protocolului descris anterior de către grupul nostru de cercetare [32]. Această etapă a studiului s-a realizat în condiții standard de temperatură ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), umiditate ($50\pm 5\%$), sub supraveghere medicală, după o perioadă de acomodare cu mediul experimental. Toți subiecții incluși în studiu au primit recomandarea de a evita efortul fizic intens și consumul de medicamente sau substanțe ce ar putea avea efecte asupra microvascularizației cutanate (ex alcool, cafea, ceai, cafeină, nicotină) pe o perioadă de minim 6 ore înaintea examinării.

Pentru inducerea reacției inflamatorii neurogenice cutanate, a fost aplicată **soluția de capsaicină 1%** la nivelul tegumentului de pe fața dorsală a mâinii non-dominate, în volum de 7.5 μl , cu ajutorul unei pipete automate (Biohit Prolien Single- Channel Pipettor, Variable Volume, 0.5-10 μl). Înainte de aplicarea soluției, s-a verificat absența leziunilor de orice fel la nivelul tegumentului examinat. Peste zona investigată, unde a fost aplicată soluția de capsaicină, a fost fixat dispozitivul de contact cutanat alcătuit dintr-un disc de plastic dublu-adeziv, atașat de un inel metalic, care se cuplează la obiectivul magnetic al microscopului confocal. Dispozitivul de contact cutanat a permis izolarea și imobilizarea pielii în timpul examinării, distribuția uniformă a soluției de capsaicină 1% la nivelul suprafeței tegumentare

acoperite de discul dublu-adeziv și a permis preluarea de imagini de microscopie confocală de reflectanță *in vivo* din aceeași zonă la 0 și 30 minute după aplicarea capsaicinei.

Imaginile de microscopie confocală de reflectanță au fost preluate *in vivo* de la nivelul de la nivelul feței dorsale a mâinii non-dominante, cu ajutorul instrumentului VivaScope 1500 (VivaScope 1500, Lucid. Inc., Rochester, NY), folosind lungimea de undă de 830 nm a sursei laser. Pentru fiecare subiect au fost obținute mozaicuri cu suprafața de 5/5 mm, de la nivelul joncțiunii dermoepidermice, din aceeași zonă cutanată, la 0 și 30 minute după aplicarea capsaicinei. La acest nivel, în secțiunile optice orizontale, lumenul anșelor capilare este vizibil sub forma unor discuri întunecate situate în centrul papilelor dermice, delimitate de structuri circulare strălucitoare formate din celule bazale epidermice (**Fig. 7.1**).

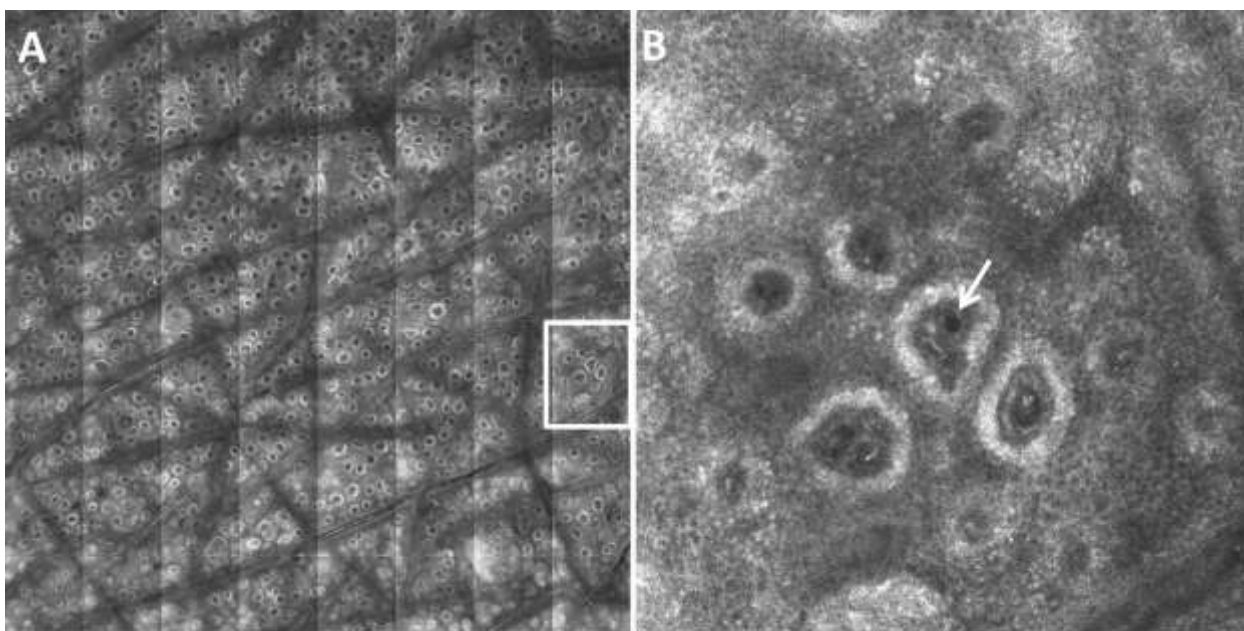


Fig. 7.1. Joncțiunea dermoepidermică în imagini de microscopie confocală de reflectanță *in vivo*. (A) Mozaic (5x5 mm) și (B) detaliu din mozaicul precedent (0.5x0.5 mm) în care lumenul anșelor capilare este vizibil sub forma unor discuri întunecate (săgeata) situate în centrul papilelor dermice.

Evaluarea imaginilor de *in vivo* RCM s-a realizat de către 2 examinatori în mod independent, fără să aibă acces la alte informații ale subiecților, cu ajutorul programului de analiză a imaginilor ImageJ 1.45 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Pentru fiecare mozaic de 5x5

mm, au fost identificate papilele dermice cu lumene capilare vizibile, iar pentru fiecare subiect au fost investigate capilarele din minimum 15 papile dermice. Măsurătorile au fost efectuate după ce a fost setată scala de 2 pixeli/ μm . Parametrii mășurați ai capilarelor papilelor dermice au fost suprafața de secțiune, perimetrul și diametrul maxim (Feret) (**Fig 7.2**).

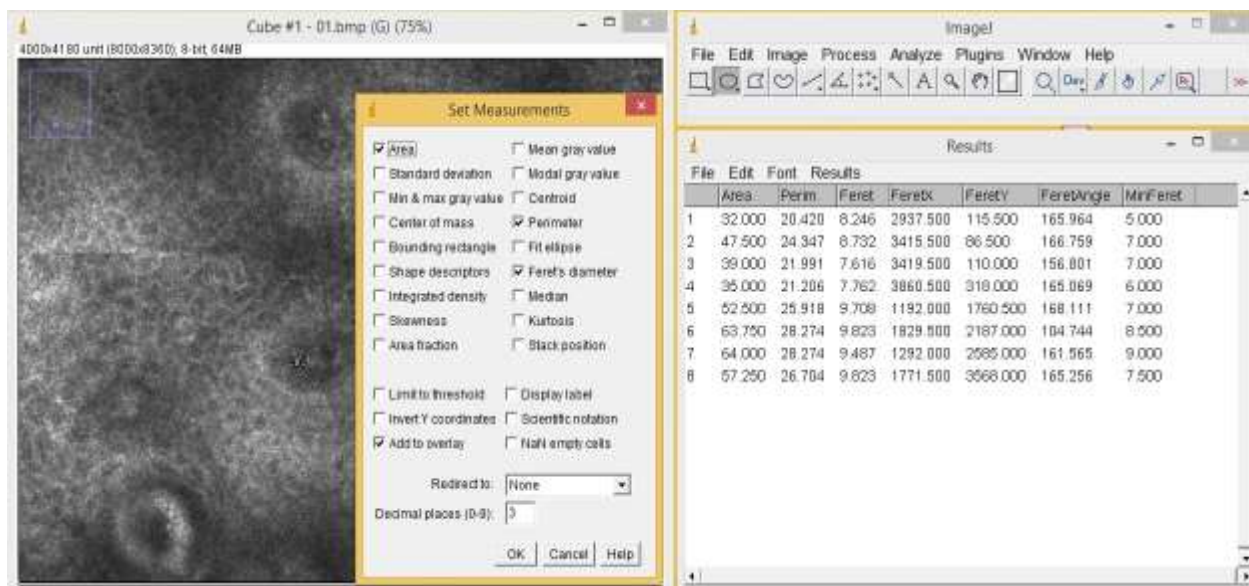


Fig. 7.2. Parametrii microvascularizației cutanate (arie, perimetru, diametru maxim Feret) mășurați cu ajutorul programului de analiză a imaginilor Image J 1.45

Rezultate. Discuții

Studiul nostru arată pentru prima dată rolul microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* în detectarea afectării funcționalității fibrelor nervoase periferice în diabetul zaharat, prin evaluarea răspunsului neurovascular cutanat în cadrul inflamației neurogenice cutanate induse de capsaicină.

Microscopia confocală de reflectanță *in vivo* (in vivo RCM) este o tehnică imagistică nouă, ce permite evaluarea non-invazivă și în timp real a microvascularizației cutanate [31, 32, 52]. Spre deosebire de alte tehnici non-invazive, in vivo RCM permite evaluarea efectelor capsaicinei asupra capilarelor papilelor dermice și fluxului sanguin cutanat cu o rezoluție mare, qvasi-microscopică [31, 32]. De asemenea, caracterul non-invaziv al examinării oferă posibilitatea examinării aceleiași zone cutanate la diferite intervale de timp pentru studierea în

dinamică a proceselor fiziologice sau patologice cu localizare cutanată [42, 53, 54]. Astfel, *in vivo* RCM este o metoda promițătoare pentru evaluarea reactivității neurovasculare cutanate și ar putea fi utilizată pentru diagnosticarea alterărilor funcționale ale fibrelor nevoase și microvascularizației cutanate. În acest sens, există studii recente în care se investighează răspunsul microvascularizației cutanate [32] și a fluxului sanguin capilar, în timp real, la diferiți stimuli topici [31, 32, 55, 56]. Grupul nostru de cercetare a descris pentru prima dată în literatura internațională posibilitatea utilizării *in vivo* RCM pentru cuantificarea răspunsului vasodilatator și a fluxului sanguin cutanat în cadrul inflamației neurogenice cutanate induse de capsaicină la subiecți sănătoși [31, 32]. Efectele capsaicinei asupra microvascularizației cutanate sunt mediate prin activarea receptorului TRPV1, localizat în principal la nivelul fibrelor nevoase nemielinizate C și mielinizate A δ [24, 39]. Activarea receptorului TRPV1 este urmată de eliberarea neuropeptidelor SP și CGRP din terminațiile nevoase, care au efect vasodilatator, cresc permabilitatea vasculară și induc degranularea mastocitelor, cu amplificarea răspunsului inflamator [57]. Având în vedere faptul că la nivelul pielii predomină fibrele nemielinizate de tip C, sensibile la capsaicină, implicate în detecția stimulilor nociceptivi [58, 59], răspunsul neurovascular cutanat din cadrul inflamației neurogenice induse de capsaicina aplicată topic este un model ideal pentru investigarea funcționalității fibrelor nevoase cutanate nociceptive la oameni [31, 32, 37, 39, 60]. Alte metode de evaluare a funcționalității fibrelor nevoase subțiri cuprind evaluarea răspunsului vasodilatator în urma aplicării de stimuli aplicați local precum acetocolină [28], căldură [29, 30], capsaicină [32] sau în cadrul reflexului de axon [33, 34]. Alterarea acestui răspuns vasodilatator, evaluat în cele mai multe cazuri cu ajutorul fluximetriei laser-Doppler, apare în stadiile inițiale ale neuropatiei diabetice, când testarea senzorială cantitativă este nemodificată, sugerând faptul că alterarea reactivității neurovasculare poate reprezenta un marker precoce al disfuncției fibrelor nevoase subțiri [26, 28]. Rezultatele noastre sunt în concordanță cu aceste observații, pacienții cu diabet zaharat având valori semnificativ mai mici ale răspunsului vasodilatator cutanat la capsaicină în comparație cu subiecții sănătoși. În plus, pacienții care asociau neuropatie periferică la testarea electrofiziologică au avut valori semnificativ mai mici, atât față de cei fără neuropatie, cât și față de subiecții sănătoși (**Fig. 7.49, 7.56, 7.60 -7.62**).

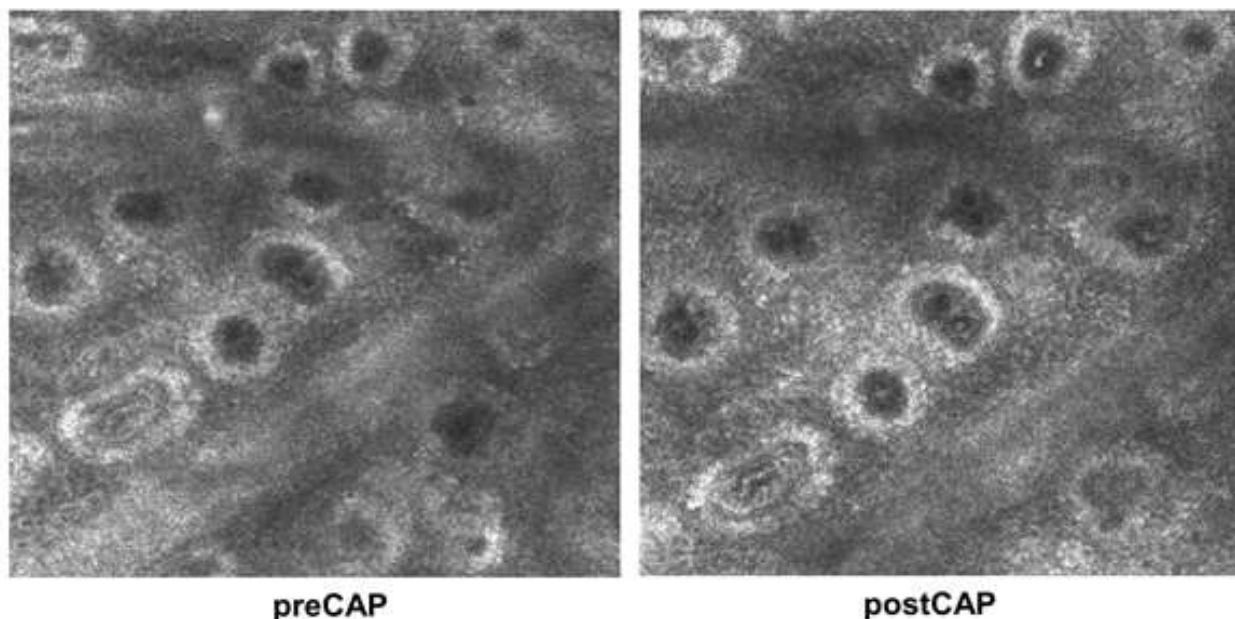


Fig. 7.49 . Imagini de microscopie confocală de reflectanță in vivo preluate de la un subiect sănătos (Lot Control) înainte (preCAP) și după (postCAP) aplicarea topică a capsaicinei.

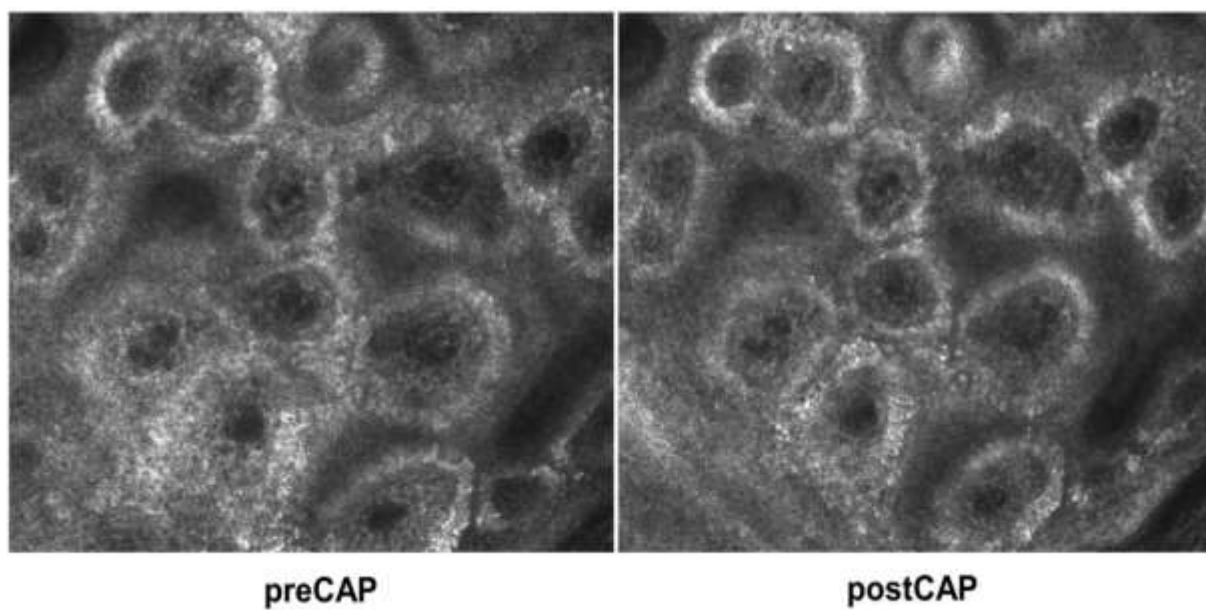


Fig. 7.56. Imagini de microscopie confocală de reflectanță in vivo preluate de la un subiect cu diabet zaharat și neuropatie la testarea electrofiziologică (Lot DCN) înainte (preCAP) și după (postCAP) aplicarea topică a capsaicinei.

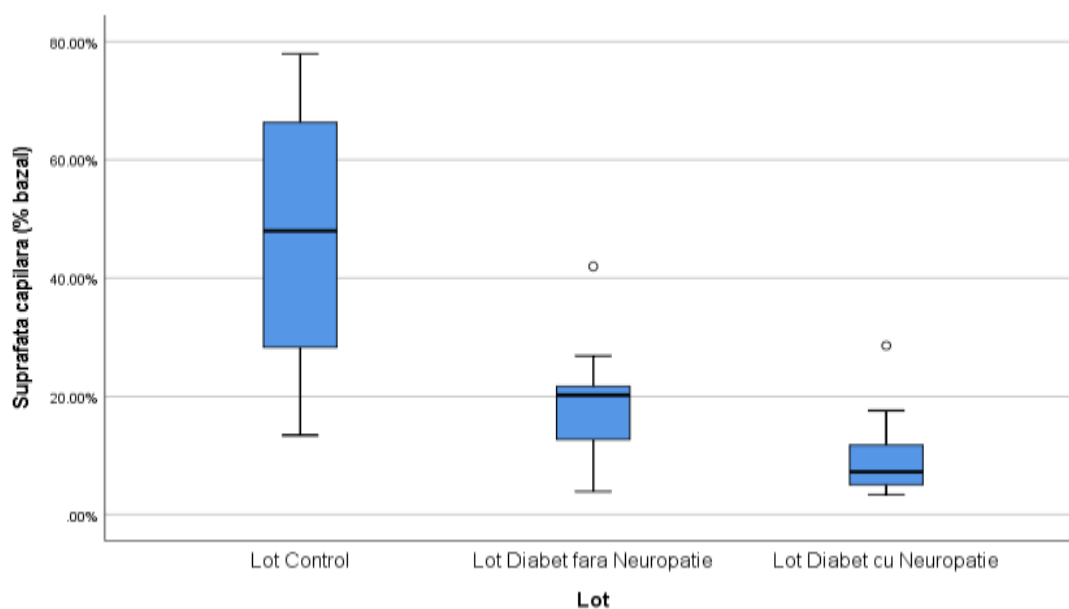


Fig. 7.60. Comparația modificărilor procentuale de suprafață capilară ale valorilor la 30 de minute față de valorile bazale între loturile selectate (valori $p < 0.05$ Lot Control vs Lot DFN vs Lot DCN, Kruskal-Wallis H Test, analiza post-hoc Dunn-Bonferroni Test)

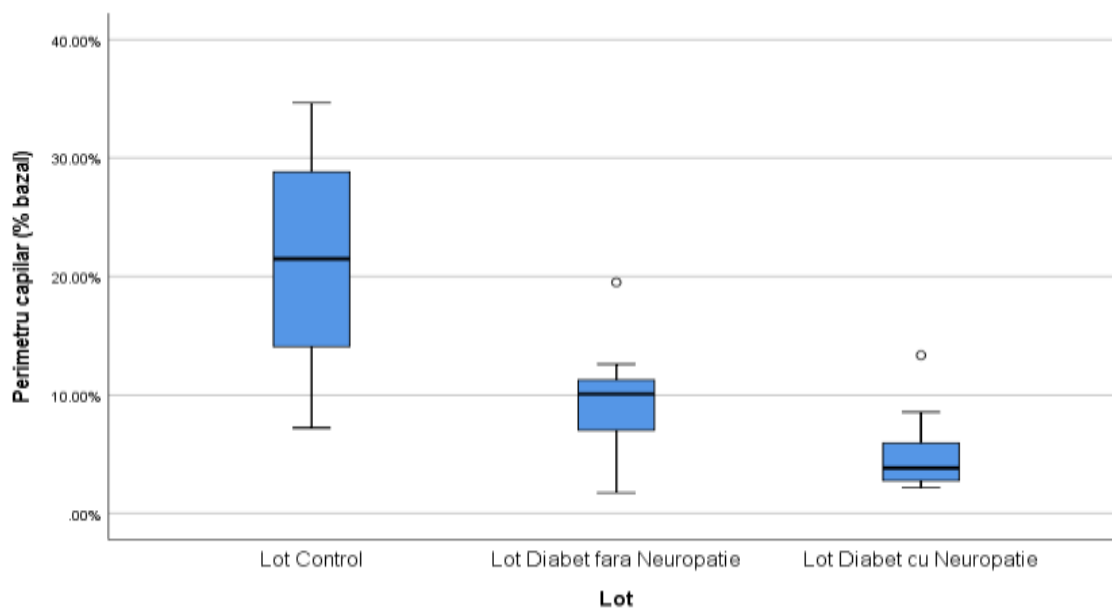


Fig. 7.61. Comparația modificărilor procentuale de perimetru capilar ale valorilor la 30 de minute față de valorile bazale între loturile selectate (valori $p < 0.05$ Lot Control vs Lot DFN vs Lot DCN, Kruskal-Wallis H Test, analiza post-hoc Dunn-Bonferroni Test)

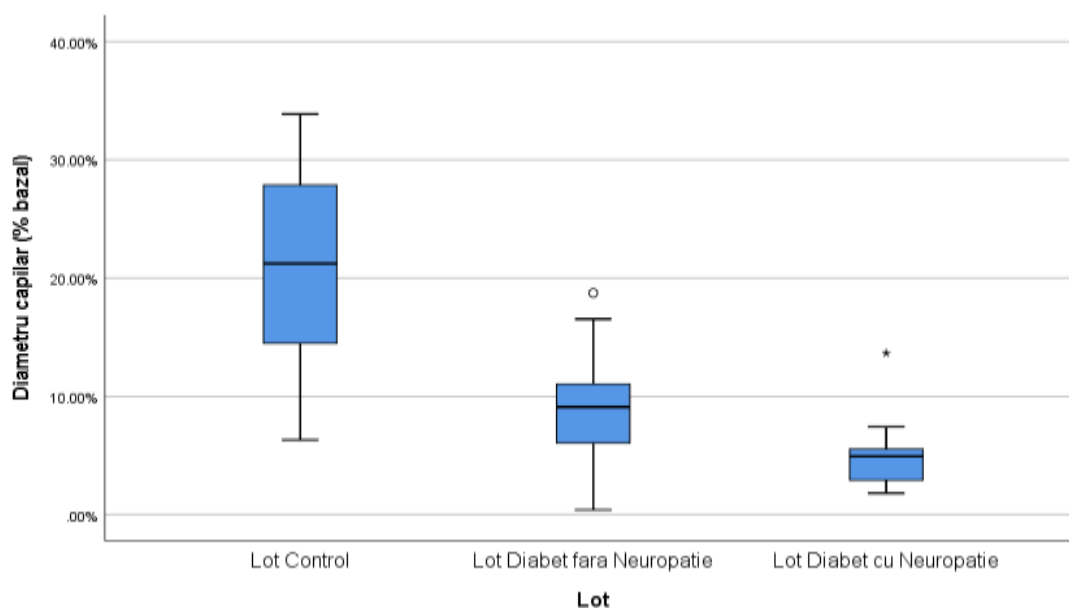


Fig. 7.62. *Comparația modificărilor procentuale de diametru capilar ale valorilor la 30 de minute față de valorile bazale între loturile selectate (valori $p < 0.05$ Lot Control vs Lot DFN vs Lot DCN, Kruskal-Wallis H Test, analiza post-hoc Dunn-Bonferroni Test)*

Prin urmare, disfuncția fibrelor nervoase periferice este prezentă în diabetul zaharat, înainte de apariția modificărilor electrofiziologice. La baza diminuării răspunsului neurovascular la capsaicină poate sta reducerea expresiei neuropeptidelor SP, CGRP și a receptorului TRPV1, observată la nivelul fibrelor nervoase subțiri nociceptive în cazul pacienților cu diabet zaharat, care precede scăderea densității fibrelor nervoase intraepidermice [22, 25]. În studiul nostru, modificările de reactivitate neurovasculară s-au corelat pozitiv cu amplitudinea conducerii nervoase și am putut realiza un model de predicție a neuropatiei diabetice periferice utilizând modificările parametrilor microvascularizației cutanate după aplicarea topică a capsaicinei (răspunsul neurovascular cutanat). Rezultatele analizei ROC (receiver operating characteristic) arată că toți cei 3 parametri ai răspunsului neurovascular cutanat (suprafață, perimetru, diametru) au un nivel excelent și semnificativ ($p < 0.01$) de predicție având valori ale ariei de sub curbă de 0.855

(95% C.I.: 0.727-0.982) – suprafață capilară, 0.861 (95% C.I.: 0.736-0.986) – perimetru capilar, 0.842 (95% C.I. : 0.717-0.968) – diametru capilar (**Fig. 7.87**). Conform curbei ROC, s-a observat că: o modificare a **suprafeței capilare** la 30 de minute de la administrarea capsaicinei **de sub 12.31%** față de valoarea bazală are o sensibilitate de 81.8% și o specificitate de 86.7% de a prezice existența neuropatiei; o modificare a **perimetrului capilar** la 30 de minute de la administrarea capsaicinei **de sub 6.57%** față de valoarea bazală are o sensibilitate de 81.8% și o specificitate de 86.7% de a prezice existența neuropatiei; o modificare a **diametrului capilar** la 30 de minute de la administrarea capsaicinei **de sub 5.82%** față de valoarea bazală are o sensibilitate de 81.8% și o specificitate de 86.7% de a prezice existența neuropatiei.

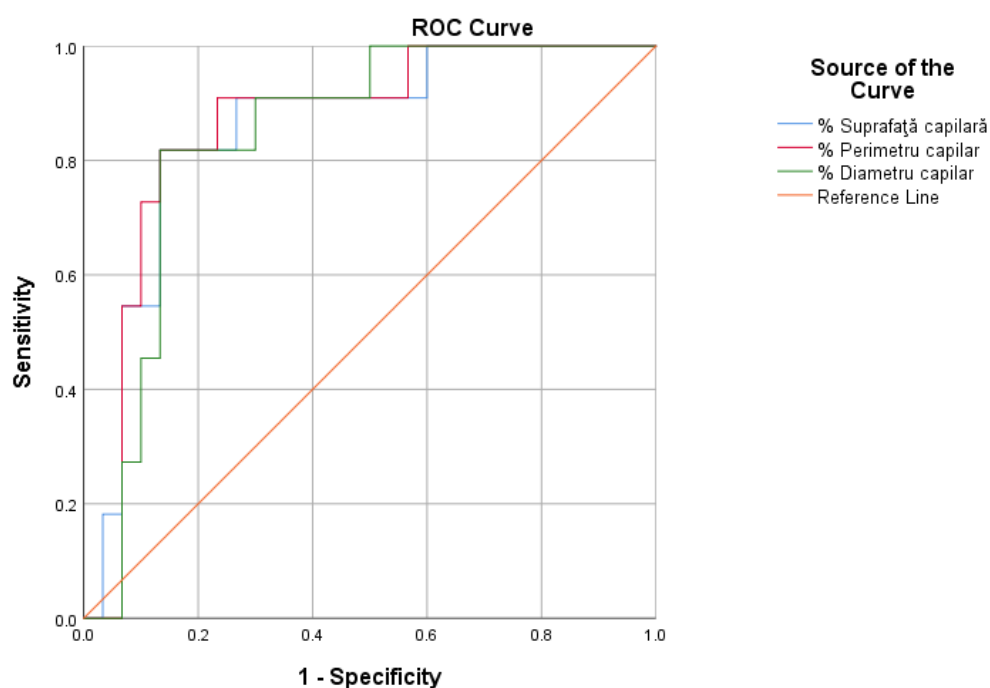


Fig. 7.87. Curbă AUC-ROC pentru evaluarea predicției neuropatiei diabetice periferice utilizând parametrii răspunsului neurovascular cutanat urmăriți în studiu

În plus, pacienții cu valori mai mari ale glicemiei au avut răspunsuri mai diminuate ale reactivității neurovasculare la capsaicină, sugerând importanța controlului glicemic în prevenirea progresiei afectării fibrelor nervoase în diabetul zaharat.

Studiul de față prezintă anumite **limite**, care trasează **direcții viitoare de cercetare**. Prezența tulburărilor de sensibilitate la examenul clinic neurologic s-a asociat cu un răspuns vasodilatator mai diminuat în urma aplicării capsaicinei, însă diferențele înregistrate nu ating pragul semnificației statistice. Evaluarea răspunsului neurovascular cutanat la capsaicină cu ajutorul *in vivo* RCM trebuie extinsă pe un număr mai mare de subiecți sănătoși și pacienți cu diabet zaharat cu și fără neuropatie diabetică pentru a putea stabili valoarea diagnostică a metodei. De asemenea, sunt necesare studii suplimentare longitudinale în care să se urmărească evoluția în timp a răspunsului neurovascular la capsaicină la pacienții cu diabet zaharat fără neuropatie la examenul clinic și testarea electrofiziologică. Am evaluat răspunsul vasodilatator cutanat la 30 minute după aplicarea capsaicinei pe fața dorsală a mâinii non-dominante, pornind de la observațiile celor 2 studii anterior publicate de către grupul nostru de cercetare, realizate pe subiecți sănătoși [31, 32]. Răspunsul vasodilatator cutanat poate fi observat prin *in vivo* RCM la 10 minute de la aplicarea capsaicinei, cu menținerea acestuia la 25 și 40 minute de la administrarea topică. La nivelul feței dorsale a mâinii există un număr mare de papile dermice, iar microvascularizația cutanată poate fi evaluată cu ușurință la acest nivel prin *in vivo* RCM. Cu toate că afectarea fibrelor nervoase în neuropatia diabetică este mai accentuată distal, alterarea reactivității microvascularizației cutanate nu prezintă o astfel de distribuție, însă răspunsul diminuat al fibrelor vasomotorii poate contribui la aceasta [61]. O altă direcție de cercetare viitoare este evaluarea diferențelor răspunsului neurovascular cutanat între extremitățile superioare și inferioare la pacienții cu diabet zaharat, deși există studii care arată că răspunsul vasodilatator în urma aplicării locale de căldură nu diferă între membre la acești pacienți [61].

În concluzie, rezultatele noastre demonstrează pentru prima dată utilitatea microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* în detectarea și monitorizarea afectării funcționalității fibrelor nervoase periferice în diabetul zaharat, prin evaluarea răspunsului neurovascular cutanat în cadrul inflamației neurogenice cutanate induse de capsaicină.

Concluzii

1. Microscopia confocală de reflectanță in vivo poate evidenția modificările parametrilor microvascularizației cutanate atât la subiecții sănătoși, cât și la pacienții cu diabet zaharat

2. În condiții bazale, nu există diferențe semnificative din punct de vedere al parametrilor capilarelor papilelor dermice între subiecții sănătoși, pacienții cu diabet zaharat cu și fără neuropatie periferică la testarea electrofiziologică.

3. Aplicarea topică a capsaicinei induce produce vasodilatația capilarelor papilelor dermice în cadrul inflamației neurogenice cutanate induse de capsaicină (răspusul neurovascular cutanat), ce poate fi evidențiată cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță atât în rândul subiecților sănatoși, cât și în rândul subiecților diabetici

4. Pacienții cu diabet zaharat au avut valori semnificativ mai mici ale răspunsului neurovascular la capsaicină în comparație cu subiecții sănătoși. Pacienții diabetici cu neuropatie periferică la testarea electrofiziologică au avut valori semnificativ mai mici ale răspunsului neurovascular la capsaicină atât față de cei fără neuropatie, cât și față de subiecții sănătoși.

5. Modificările de reactivitate neurovasculară s-au corelat pozitiv cu amplitudinea conducerii nervoase și negativ cu valorile glicemiei bazale. Deși diferențele înregistrate nu ating pragul semnificația statistică, se observă modificări procentuale mai importante ale parametrilor microvascularizației cutanate în cazul pacienților care nu prezintă tulburări de sensibilitate față de cei cu sensibilități neafectate la examenul clinic.

Investigarea micromorfologică a unor structuri nervoase cutanate cu ajutorul *in vivo* RCM la pacienții cu diabet zaharat (studiul 3)

Obiective specifice

- a) identificarea **corpusculilor Meissner** în imaginile de *in vivo* RCM preluate de la nivelul tegumentului eminentei tenare
- b) evaluarea **densităților corpusculilor Meissner (MCs/mm²)** în imaginile de ***in vivo* RCM** la subiecți sănătoși și la pacienți diabet zaharat cu și fără neuropatie diabetică periferică
- c) corelarea **densităților corpusculilor Meissner (MCs/mm²)** cu parametrii biochimici, neurologici (chestionar MNSI, amplitudine, viteza de conducere nervoasă, reactivitatea neurovasculară la capsaicină)

Materiale și metode

10 pacienți cu diabet zaharat și 13 subiecți sănătoși cu vârste apropiate au fost incluși în acest studiu conform criteriilor de includere în Lotul Diabet, respectiv lotul Control și criteriilor de excludere prezentate în Metodologia generală a cercetării. Pe scurt, Lotul Diabet a fost alcătuit din pacienți cu diabet zaharat de tip 1 (n=7) sau 2 (n=3), conform criteriilor Asociației Americane de Diabet, Lotul Control din subiecți sănătoși, fără diabet zaharat sau neuropatie periferică și din ambele loturi au fost excluși subiecții cu afecțiuni care se asociază cu neuropatie periferică, altele decât diabetul zaharat. Toți subiecții incluși în studiu au parcurs cele 3 etape ale diagramei studiului (**Tabel V.1**).

După ce au semnat Consimțământul Informat, au fost înregistrate date referitoare la profilurile demografice și clinice ale subiecților incluși în studiu (vârstă, sex, înălțime, greutate, statutul de fumător/nefumător, data diagnosticării diabetului, tipul de diabet, antecedente personale patologice, tratament) și au fost recoltate probe de sânge venos în vacutainere fără anticoagulant pentru determinarea parametrilor biochimici și în vacutainere cu EDTA pentru determinarea parametrilor de stres oxidativ. Parametrii biochimici

determinați din ser au fost: glicemia bazală (mg/dl), HbA1c (%), colesterolul total (mg/dl), trigliceride (mg/dl), GPT (U/L), GOT (U/L), GGT (U/L), creatinina serică (mg/dl), ureea serică (mg/dl), acidul uric seric (mg/dl), albumina serică (g/dl), proteine totale serice (g/dl) și HDL- colesterolul (mg/dl). Valoarea LDL-colesterolului a fost calculată cu formula Friedewald [51]. Pentru determinarea parametrilor de stres oxidativ, a fost cuantificată producția de radicali liberi din cadrul puseului respirator în momentul emisiei maxime de chemiluminiscență și exprimată sub forma valorii maxime (RB LM/PMA (Peak), RB LG/PMA (Peak), RB LM/OZ (Peak), RB LG/OZ (Peak)) și a ariei de sub curba (RB LM/PMA (AUC), RB LG/PMA (AUC), RB LM/OZ (AUC)).

În următoarea etapă a studiului, subiecții din lotul Diabet au fost evaluați din punct de vedere neurologic prin intermediul chestionarului MNSI, a examinării clinice a sensibilităților, reflexelor și forței musculare și testării neurofiziologice (studierea conducerii nervoase). Ulterior, au fost evaluate microvascularizația cutanată de la nivelul feței dorsale a mâinii în cadrul reacției inflamatorii induse de capsaicină (protocol detaliat în capitolul 7) și densitatea corpusculilor Meissner de pe fața palmară cu microscopul confocal de reflectanță in vivo.

Evaluarea in vivo a corpusculilor Meissner cu ajutorul microscopului confocal de reflectanță (VivaScope 1500, Lucid. Inc., Rochester, NY) s-a realizat la nivelul tegumentului eminentei tenare aparținând membrului superior non-dominant. După ce s-a aplicat o picătură de ulei de imersie (Crodamol STS, Croda, SUA) peste zona de examinat, a fost aplicat dispozitivul de contact cu tegumentul alcătuit dintr-un disc adeziv de plastic atașat unui inel metalic de care a fost fixat apoi obiectivul magnetic al microscopului confocal. Uleiul de crodamol (Crodamol STS; Croda Inc., Edison, NJ, SUA) este cel mai folosit mediu de imersie pentru preluarea imaginilor de microscopie confocală de reflectanță in vivo. Se aplică la interfața piele – disc de plastic adeziv și are un indice de refracție (1.50) apropiat de cel al stratului cornos (1.55), facilitând penetrarea în adâncime a luminii în timpul examinării [62]. Imagini-mozaic cu dimensiunea de 5x5 mm, formate din imagini individuale, adiacente de 500x500 μm, achiziționate într-un singur plan orizontal [38] au fost obținute la adâncimi succesive de la nivelul joncțiunii dermo-epidermice (JDE). Criteriile pentru indentificarea corpusculilor Meissner în imaginile de in vivo RCM au fost: localizarea în interiorul papilelor

dermice din pielea glabră; orientarea axului lor longitudinal perpendicular pe JDE; structura încapsulată, cu arhitectura axonală lobulată în interior (**Fig. 8.1**); prezența între 0-2 corpusculi Meissner într-o papilă dermică [38, 63]. Corpusculii Meissner au fost evaluați pe o suprafață de minim 16 mm^2 din fiecare mozaic. Imaginile-mozaic obținute de la adâncimi succesive au fost comparate pentru a evita numărarea de două ori a MCs. Densitatea MCs a fost exprimată ca număr de Corpuscului Meissner/ mm^2 .

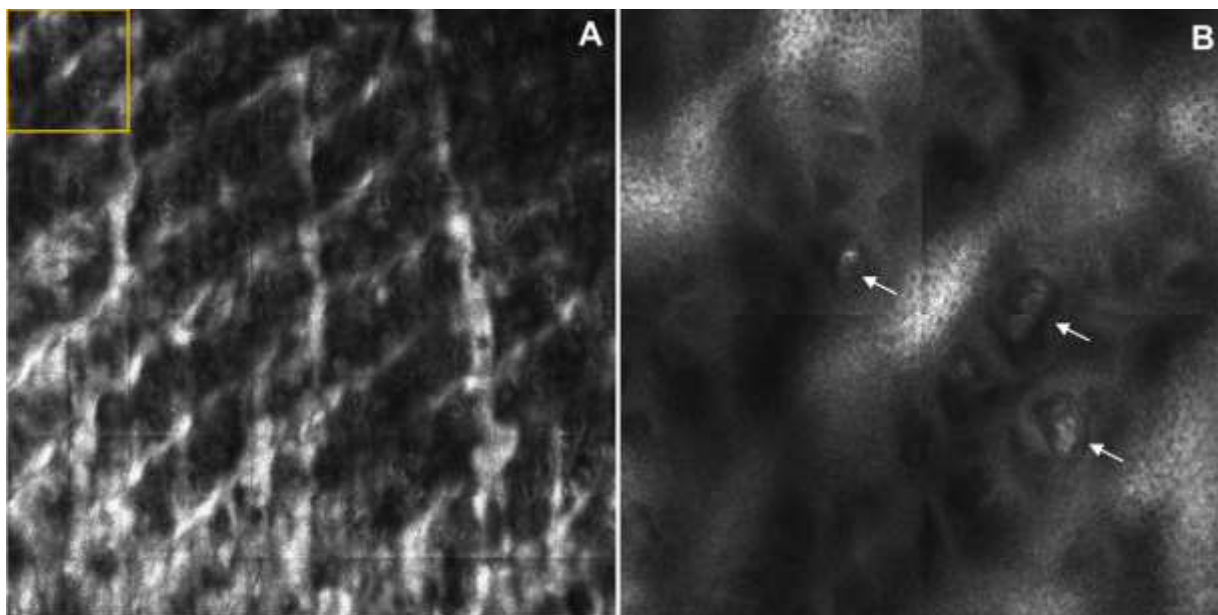


Fig. 8.1. Imagini de microscopie confocală de reflectanță *in vivo* preluate de la nivelul eminentei tenare a unui subiect sănătos (A.Mozaic 5x5 mm B. detaliu 500x500 μm). Corpusculii Meissner pot fi vizualizați în interiorul papilelor dermice ca structuri rotund-ovalare strălucitoare, cu structura internă heterogenă, lobulată înconjurată de o capsulă ($\rightarrow$).

Rezultate. Discuții

În studiul nostru, arătam utilitatea microscopiei confocale de reflectanță *in vivo* în evaluarea micromorfologică a unor structuri nervoase cutanate și rolul acestei tehnici imagistice în cuantificarea modificărilor ce apar la nivelul corpusculilor Meissner în diabetul zaharat și neuropatia periferică. Corpusculii Meissner (MCs) sunt principalii mecano-receptori din pielea glabră de la nivelul palmelor și plantelor [63, 64]. Sunt structuri nervoase

încapsulate, localizate în interiorul papilelor dermice, specializate în transmiterea senzației tactile fine și a vibrațiilor cu frecvență joasă către sistemul nervos central [65]. Fiecare corpuscul Meissner primește la baza sa una sau mai multe terminații nervoase provenite din fibre nervoase aferente mielinizate, însă conțin o rețea lobulată alcătuită atât din fibre mielinizate A β , cât și din fibre nemielinizate C [63-65]. Fibrele subțiri de tip C pot fi peptidergice și exprimă peptidul asociat genei calcitoninei (CGRP) și substanța P (SP) sau non-peptidergice și exprimă receptorul TRPV1, proprietățile lor imunologice sugerând implicarea corpusculilor Meissner și în sensibilitatea nociceptivă [64].

MCs joacă un rol esențial în sistemul somato-senzorial uman, din acest motiv examinarea densității acestora prezintă un interes crescut în cadrul neuropatiilor periferice [63]. Valori scăzute ale densității corpusculilor Meissner au fost identificate în biospsiile de tegument prelevate de la nivelul falangei distale a degetelor în cazul pacienților cu diabet zaharat, care nu prezentau modificări la testarea electrofiziologică [66]. De asemenea, în neuropatiile cu predominanță afectării fibrelor subțiri, densitățile corpusculilor Meissner s-au corelat cu reducerea densității de fibre nervoase intraepidermice [67]. Cu toate acestea, prelevarea biospsiilor cutanate de la nivelul pielii glabre pentru evaluarea densității corpusculilor Meissner este o procedură dureroasă, mai invazivă decât prelevarea de tegument cu păr pentru evaluarea densității de fibre nervoase intraepidermice [38], în ambele situații existând riscul unei vindecări întârziată la pacienții cu diabet zaharat.

Microscopia confocală de reflectanță *in vivo* (*in vivo* RCM) permite investigarea morfologiei structurilor cutanate de la nivelul epidermului și dermului papilar, cu o rezoluție înaltă, apropiată de cea a examinării histologice. Posibilitatea investigării non-invazive, *in vivo* și în timp real a structurilor tegumentului, oferă posibilitatea repetării examinării la diferite intervale de timp a aceleiași regiuni cutanate. Această metodă a fost aplicată în evaluarea a diferite tipuri de neuropatie senzorială și prezintă un potențial ridicat în cazul neuropatiei diabetice periferice atât pentru identificarea în stadii incipiente, cât și pentru monitorizarea progresiei bolii și a răspunsului la tratament.

În imaginile de *in vivo* RCM, corpusculii Meissner pot fi vizualizați în interiorul papilelor dermice ca structuri rotund-ovalare strălucitoare, cu structura internă heterogenă, lobulată înconjurată de o capsulă (**Fig. 8.1**). În studiul nostru am calculat densitatea de

corpusculi Meissner pe mm^2 de suprafață tegumentară, după ce am numărat MCs în imaginile preluate cu in vivo RCM de la nivelul eminentei tenare. MCs pot fi vizualizați și la nivelul tegumentului falangei distale a degetelor, haluce sau maleola externă, însă stabilitatea examinării este mai mare la nivelul eminentei tenare. În cazul subiecților sănătoși, am obținut o valoare medie de 3.2 MCs/mm^2 la nivelul eminentei tenare, iar femeile au avut densități semnificativ mai mari față de bărbați. Aceste rezultate sunt în concordanță cu studiile anterioare [38], o posibilă explicație pentru densitățile mai mici ale corpusculilor Meissner la bărbați fiind suprafața mai mare a palmelor acestora [69]. În cazul pacienților cu diabet zaharat ($2.02/\text{mm}^2$) am obținut densități ale corpusculilor Meissner semnificativ mai mici față de subiecții sănătoși (**Fig. 8.2, Fig.8.3**), aceste diferențe corelându-se puternic negativ cu valorile glicemiei bazale și moderat negativ cu valorile creatininei serice (**Fig. 8.10, Fig.8.11**). De asemenea, pacienții cu diabet zaharat cu punctaje mari ale chestionarului MNSI au avut mai frecvent valori mai mici ale densităților corpusculilor Meissner (**Fig. 8.9**).

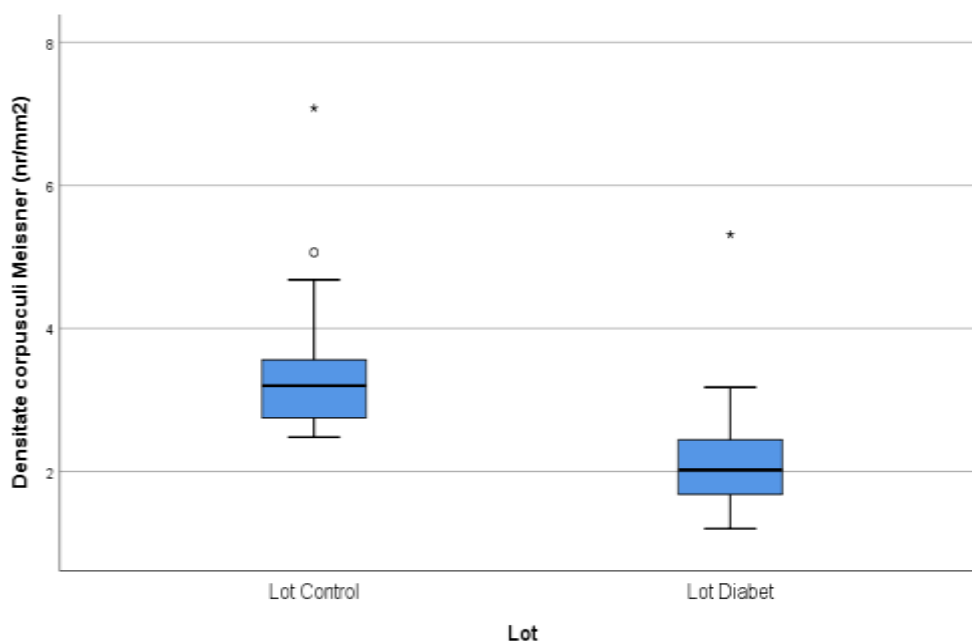


Fig. 8.2. Analiza comparativă a densităților corpusculilor Meissner (nr/mm^2) între loturi. Mediana densității corpusculilor Meissner a fost semnificativ mai mică la pacienții cu diabet zaharat ($2.02/\text{mm}^2$) față de pacienții sănătoși ($3.2/\text{mm}^2$) ($p=0.003$).

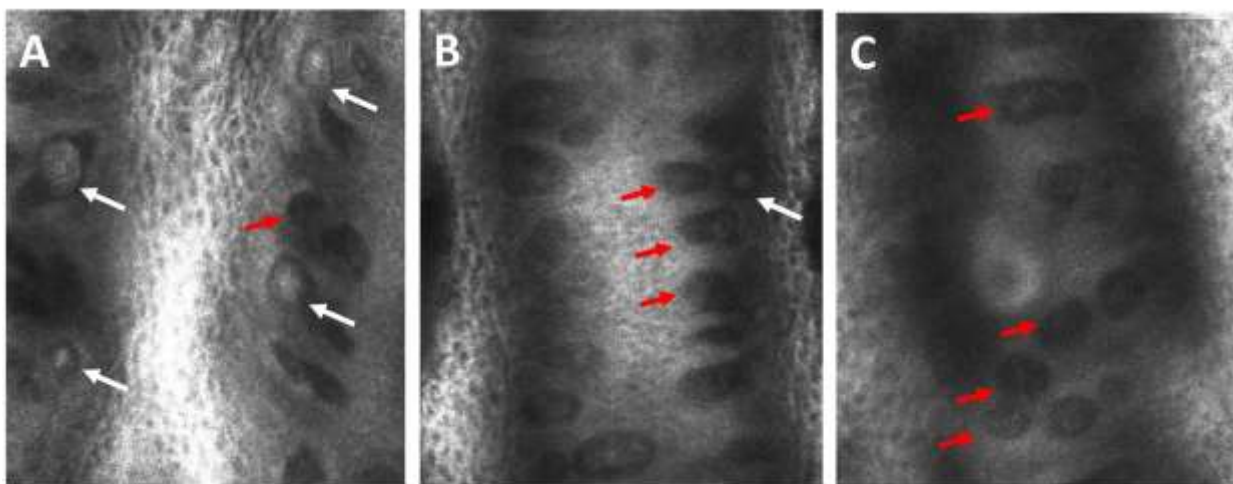


Fig. 8.3. Imagini de microscopie confocală de reflectanță in vivo ($500 \times 500 \mu\text{m}$), preluate de la nivelul eminentei tenare aparținând: (A) unui subiect sănătos, (B) unui pacient cu diabet zaharat, fără neuropatie diabetică periferică și (C) unui pacient cu diabet zaharat și neuropatie periferică (C). Se observă prezența a numeroși corpusculi Meissner (săgeți albe) în cazul subiectului sănătos, scăderea numărului de corpusculi Meissner în cazul pacientului cu diabet, fără neuropatie periferică și absența lor în papilele dermice (săgeți roșii) în cazul pacienților cu diabet și neuropatie periferică.

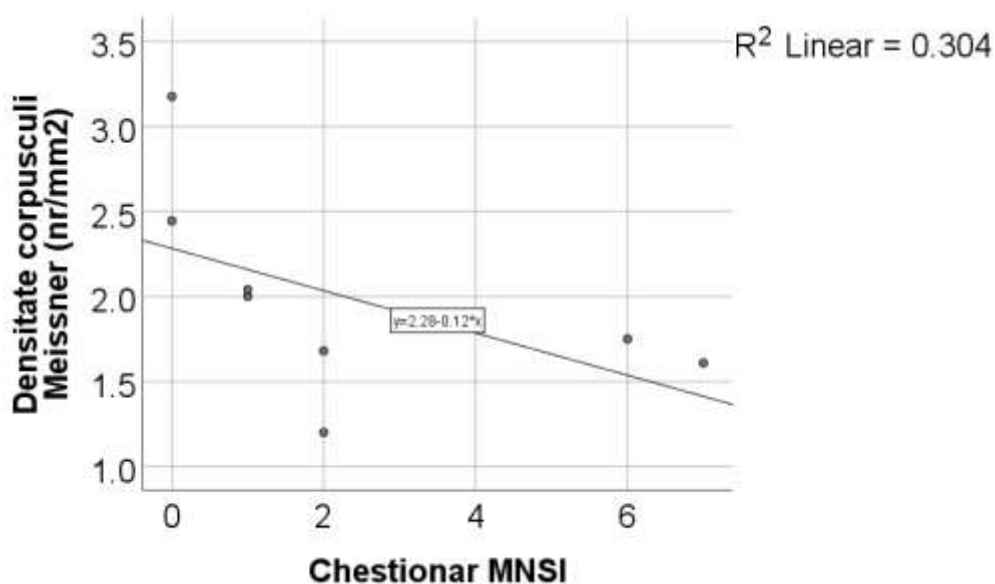


Fig. 8.9. Corelația dintre densitatea corpusculilor Meissner și punctajul MNSI. Pacienții cu valori ridicate ale punctajului MNSI s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mici ale densităților corpusculilor Meissner ($p=0.008$, $R= -0.849$).

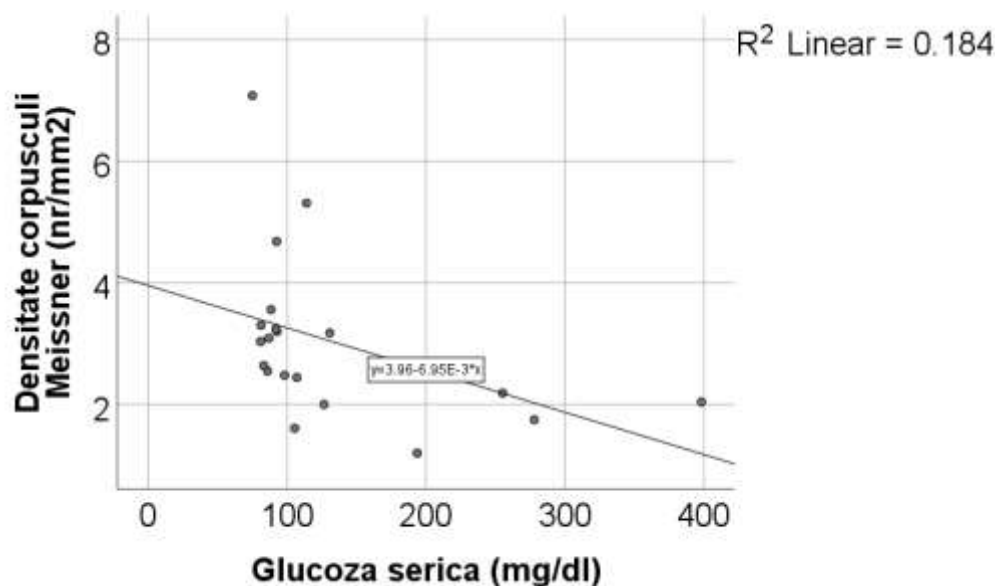


Fig. 8.10. Corelația dintre densitatea corpusculilor Meissner și valoarea glicemiei. Pacienții cu valori ridicate ale glicemiei s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mici ale densităților corpusculilor Meissner ($p=0.005$, $R= -0.598$)).

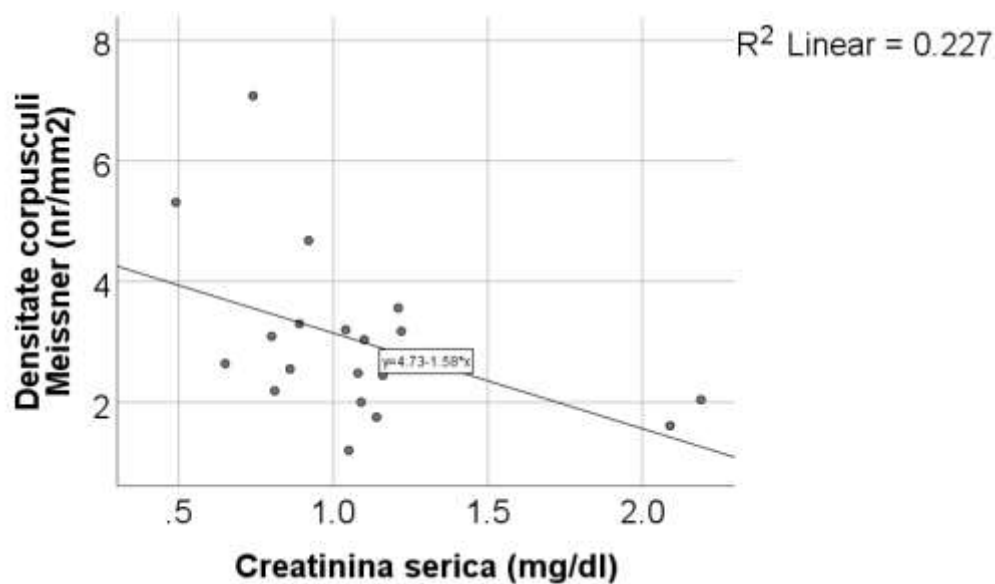


Fig. 8.11. Corelația dintre densitatea corpusculilor Meissner și creatinina serică. Pacienții cu valori ridicate ale creatininei serice s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mici ale densităților corpusculilor Meissner.

Nu am detectat asocieri semnificative între densitatea corpusculilor Meissner și amplitudinea conducerii nervoase sau răspunsul vasodilatator la capsaicină, dar valorile obținute arată o tendință spre semnificație a parametrilor de reactivitate vasculară în asociere cu densitatea corpusculilor. Această observație susține tripla inervație a corpusculilor Meissner (fibre mielinizate A β , fibre nemielinizate C peptidergice și non-peptidergice) și implicarea acestora în sensibilitatea nociceptivă [64].

Până în momentul de față, în literatura internațională există doar 2 studii publicate privind evaluarea densității corpusculilor Meissner cu ajutorul *in vivo* RCM la pacienți cu diabet zaharat și neuropatie periferică. În primul studiu, Hermann și colaboratorii [38] au investigat pentru prima dată MCs la nivelul eminentei tenare și falanga distală a degetului 5 în cazul pacienților sănătoși și 5 pacienți cu neuropatie senzorială periferică, dintre care doar 1 pacient inclus avea neuropatie diabetică. Al doilea studiu, realizat pe loturi mai mari alcătuite din subiecți sănătoși și pacienți cu diabet zaharat și neuropatie diabetică, a demonstrat rolul evaluării densității corpusculilor Meissner cu ajutorul *in vivo* RCM în evaluarea non-invazivă și obiectivă a afectării fibrelor nervoase mielinizate din neuropatia diabetică periferică [70]. Rezultatele noastre vin ca o completare la aceste studii, sugerând faptul că reducerea densităților corpusculilor Meissner este prezentă la pacienții diabetici înainte de apariția modificărilor electrofiziologice și poate reprezenta un marker al afectării fibrelor nervoase nemielinizate (răspunsul vasodilatator la capsaicină). În plus, am arătat pentru prima dată asocierea dintre reducerea densității corpusculilor Meissner și valorile glicemiei și creatininei serice în diabetul zaharat, observații care reflectă mecanismele patogenice complexe ale neuropatiei diabetice și importanța controlului glicemic în prevenirea progresiei acesteia.

Studiul de față prezintă însă anumite **limite**, care trasează **direcții viitoare de cercetare**. În primul rând, evaluarea micromorfologică a MCs cu ajutorul *in vivo* RCM trebuie extinsă pe un număr mai mare de subiecți sănătoși și pacienți cu diabet zaharat cu și fără neuropatie diabetică pentru a putea stabili valoarea diagnostică a metodei. Apoi, sunt necesare stabilirea unor valori de referință care să țină cont de sexul, vârsta și suprafața corporală a subiecților, dar mai ales a unor protocoale standard ale metodei pentru a evita variabilitatea rezultatelor obținute.

Am evaluat pielea glabră de la nivelul emineței tenare, unde densitatea de corpusculi Meissner este mai mică față de densitățile evidențiate anterior la nivelul degetului 3 sau degetului 5 atât prin marcarea imunohistochimică [68], dar și cu *in vivo* RCM [38, 70]. Având în vedere valorile mai mici ale densităților de corpusculi Meissner obținute cu *in vivo* RCM în comparație cu raportările anterioare din studiile de imunohistochimie, există posibilitatea ca *in vivo* RCM să nu distingă corpusculii suprapuși situați în același plan vertical, dacă distanța dintre ei este mai mică de 30 μm . De asemenea, în studiul nostru am putut vizualiza între 0 și 2 corpusculi Meissner în aceeași papilă dermică, pe când în piesele de biopsie cutanată cel mai frecvent pot fi identificați 2 corpusculi Meissner per papila dermică, iar probabilitatea ca 3 sau mai mulți corpusculi să fie prezenți nu este neobișnuită [68]. Pe de altă parte, secțiunile optice din *in vivo* RCM pot fi obținute și la grosimi succesive de 1 μm (Vivastack), iar rezoluția imaginilor în plan orizontal este 0.5-1 μm , astfel că este posibilă numărarea separată a corpusculilor adiacenți, situați în același plan. Valorile mai mari ale densităților de corpusculi Meissner din studiile de imunohistochimie se datorează mai degrabă micșorării probei de tegument în urma procesării tisulare necesară examenului histopatologic și necesită aplicarea factorilor de corecție [71]. În plus, *in vivo* RCM nu poate oferi informații privind inervația corpusculilor Meissner, iar corpusculii denervați nu pot fi deosebiți de cei cu fibre aferente prezente [71].

Cu toate acestea, evaluarea densității corpusculilor Meissner cu ajutorul *in vivo* RCM poate fi inclusă în evaluarea inițială non-invazivă și obiectivă a afectării structurilor nervoase în cazul pacienților cu diabet zaharat pentru screeningul și monitorizarea neuropatiei periferice.

Concluzii

1. Cu ajutorul microscopiei confocale de reflectanță *in vivo*, pot fi evaluați corpusculii Meissner din pielea glabră, atât la subiecții sănătoși, cât și la pacienții cu diabet zaharat.
2. Densitatea corpusculilor Meissner este semnificativ mai mare la femei față de bărbați.

3. Pacienții cu diabet zaharat prezintă densități ale corpusculilor Meissner semnificativ mai mici față de subiecții sănătoși, aceste diferențe corelându-se puternic negativ cu valorile glicemiei bazale și moderat negativ cu valorile creatininei serice.

4. Pacienții cu diabet zaharat și punctaje mari ale chestionarului MNSI au avut mai frecvent valori mai mici ale densităților corpusculilor Meissner.

5. Nu s-au detectat asocieri semnificative între densitatea corpusculilor Meissner și amplitudinea conducerii nervoase sau răspunsul vasodilatator la capsaicină, însă valorile arată o tendință spre semnificație a parametrilor de reactivitate vasculară în asociere cu densitatea corpusculilor.

Concluzii și contribuții personale

Neuropatia diabetică periferică este o complicație frecventă a diabetului zaharat și un factor important implicat în apariția ulcerelor plantare, având cea mai mare contribuție la necesitatea amputațiilor de membru inferior. Cu toate acestea, diagnosticarea neuropatiei diabetice periferice în stadii incipiente reprezintă în continuare o provocare, în ciuda diversității metodelor de evaluare existente. Alterarea răspunsului neurovascular cutanat în cadrul inflamației neurogenice cutanate induse de capsaicină poate reflecta disfuncția fibrelor nervoase subțiri (C și A δ), care sunt primele afectate în neuropatia diabetică periferică. Microscopia confocală de reflectanță *in vivo* (*in vivo* RCM) este o tehnică imagistică nouă ce permite investigarea morfo-funcțională a modificărilor microvascularizației cutanate în cadrul reacției inflamatorii neurogenice induse de capsaicină, cu o rezoluție înaltă, quasi-microscopică. Aceasta tehnică permite evaluarea morfologiei și a densității corpusculilor Meissner în pielea glabră a pacienților cu diabet și poate fi inclusă în evaluarea inițială non-invazivă și obiectivă a afectării structurilor nervoase în cazul pacienților cu diabet zaharat.

În cadrul acestei teze de doctorat, ne-am propus dezvoltarea unei metode de evaluare micromorfologică și funcțională a structurilor nervoase cutanate, utilă pentru diagnosticarea (în stadii subclinice) și monitorizarea neuropatiei periferice la pacienții cu diabet zaharat. Astfel, am investigat cu ajutorul *in vivo* RCM modificările microvascularizației cutanate în diverse afecțiuni tumorale/inflamatorii (studiul 1) și în cadrul reacției inflamatorii

neurogenice induse de capsaicină (răspusul neurovascular cutanat) pentru evaluarea funcționalității fibrelor nervoase periferice la pacienții cu diabet zaharat cu și fără modificări ale conducerii nervoase (studiul 2). În cadrul unui studiu mai mic realizat pe pacienți proveniți din studiul anterior, am investigat din punct de vedere micromorfologic structuri nervoase cutanate (corpusculii Meissner) cu ajutorul *in vivo* RCM la pacienții cu diabet zaharat (studiul 3). Obiectivele principale din cadrul tezei de doctorat au fost atinse având în vedere rezultatele promițătoare obținute în cadrul cercetarilor doctorale. Acestea încurajează utilizarea *in vivo* RCM pentru evaluarea funcționalității fibrelor nervoase periferice și a morfologiei și densității corpusculilor Meissner în diabetul zaharat, pentru diagnosticarea neuropatiei diabetice periferice înainte de apariția modificărilor electrofiziologice. În plus, caracterul non-invaziv ale examinării oferă posibilitatea repetării analizării la diferite intervale de timp a aceleiași regiuni cutanate, pentru monitorizarea progresiei bolii și a răspunsului la tratamentul neuroprotector.

Contribuțiile personale aduse în domeniul utilizării microscopiei confocale de reflectanță cutanate *in vivo* sunt:

1. am investigat modificările care apar la nivelul joncțiunii dermoepidermice (cu accent pe microvascularizația cutanată, celulele inflamatorii) în diverse afecțiuni tumorale/inflamatorii cutanate, cu ajutorul *in vivo* RCM.

2. am analizat rolul *in vivo* RCM în diagnosticarea non-invazivă a amiloidozei cutanate, evidențiind utilitatea clinică a tehnicii în cazul pacienților cu afecțiuni (ex:diabetul zaharat) ce pot îngreuna vindecarea după prelevarea biopsiei cutanate (**am contribuit cu a doua publicație în acest sens din literatura internațională de specialitate**).

3. **am descris pentru prima oară în literatura de specialitate** aspectul leziunilor de limfom foliculocentric cutanat primar, o formă de limfom cutanat cu celule B, în microscopia confocală de reflectanță *in vivo*.

Contribuțiile personale aduse în domeniul diagnosticării neuropatiei diabetice în stadii cât mai precoce sunt:

1. am descris pentru prima dată rolul *in vivo* RCM în detectarea afectării funcționalității fibrelor nervoase periferice în diabetul zaharat prin evaluarea răspunsului neurovascular cutanat în cadrul inflamației neurogenice cutanate induse de capsaicină.

Pacienții cu diabet zaharat au avut valori semnificativ mai mici ale răspunsului vasodilatator cutanat la capsaicină în comparație cu subiecții sanatosi. În plus, pacienții care au asociat modificari de neuropatie periferică la testarea electrofiziologică au avut valori semnificativ mai mici, atât față de cei fără neuropatie, cât și față de subiecții sănătoși. Prin urmare, disfuncția fibrelor nervoase periferice este prezentă în diabetul zaharat, înainte de apariția modificărilor electrofiziologice. În studiul nostru, modificările de reactivitate neurovasculară s-au corelat pozitiv cu amplitudinea conducerii nervoase și am putut realiza un model predicție a neuropatiei diabetice periferice utilizând modificările parametrilor microvascularizatiei cutanate după aplicarea topică a capsaicinei (răspusul neurovascular cutanat). În plus, pacienții cu valori mai mari ale glicemiei au avut răspunsuri mai diminuate ale reactivității neurovasculare la capsaicină, sugerând importanța controlului glicemic în prevenirea progresiei afectării fibrelor nervoase în diabetul zaharat.

2. am arătat utilitatea *in vivo* RCM în evaluarea micromorfologică a unor structuri nervoase cutanate și rolul acestei tehnici imagistice în cuantificarea modificărilor ce apar la nivelul corpusculilor Meissner în diabetul zaharat și neuropatia periferică.

În cazul pacienților cu diabet zaharat am obținut densități ale corpusculilor Meissner semnificativ mai mici față de subiecții sănătoși, reducerea densităților corpusculilor Meissner fiind prezentă la pacienții diabetici înainte de apariția modificărilor electrofiziologice și poate reprezenta un marker al afectării fibrelor nervoase nemielinizate (răspusul vasodilatator la capsaicină). În plus, am arătat pentru prima dată asocierea dintre reducerea densității corpusculilor Meissner și valorile glicemiei și creatininei serice în diabetul zaharat, observații

care reflectă mecanismele patogenice complexe ale neuropatie diabetice și importanța controlului glicemic în prevenirea progresiei acestora.

Dintre **direcțiile viitoare de cercetare** menționăm:

1. extinderea studiilor pe un număr mai mare de subiecți sănătoși și pacienți cu diabet zaharat cu și fără neuropatie diabetică pentru a putea stabili valoarea diagnostică a metodei.
2. stabilirea unor valori de referință, care să țină cont de sexul, vârsta și suprafața corporală a subiecților, dar mai ales a unor protocoale standard ale metodei pentru a evita variabilitatea rezultatelor obținute.
3. completarea cu studii longitudinale în care să se urmărească evoluția în timp a răspunsului neurovascular la capsaicină/densitatea de corpusculi Meissner la pacienții cu diabet zaharat fără neuropatie la examenul clinic și testarea electrofiziologică.
4. corelarea rezultatelor obținute cu examinarea morfologică și imunohistochimică a inervației cutanate (cu determinarea densității și morfologiei fibrelor nervoase intraepidermice la nivelul tegumentului cu păr și a corpusculilor Meissner în pielea glabra, a densității fibrelor nervoase imunoreactive pentru SP, CGRP, TRPV1, precum și a expresiei acestor neuropeptide și a TRPV1 la nivelul fibrelor nervoase)

Bibliografie selectivă

- [1] International Diabetes Federation. 2019 IDF Diabetes Atlas 8th edition: key messages. IDF <https://diabetesatlas.org/key-messages.html>
- [2] Tabish SA. Is Diabetes Becoming the Biggest Epidemic of the Twenty-first Century?. Int J Health Sci (Qassim). 2007 Jul;1(2):V-VIII.
- [3] Pasnoor M, Dimachkie MM, Kluding P, Barohn RJ. Diabetic neuropathy part 1: overview and symmetric phenotypes. Neurol Clin. 2013 May;31(2):425-45. doi: 10.1016/j.ncl.2013.02.004.
- [4] Deli G, Bosnyak E, Pusch G, Komoly S, Feher G. Diabetic neuropathies: diagnosis and management. Neuroendocrinology. 2013;98(4):267-80. doi: 10.1159/000358728.

- [5] Pittenger G, Vinik A. Nerve growth factor and diabetic neuropathy. *Exp Diabetes Res*. 2003 Oct-Dec;4(4):271-85. doi: 10.1155/EDR.2003.271.
- [6] Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments [published correction appears in *Diabetes Care*. 2010 Dec;33(12):2725]. *Diabetes Care*. 2010;33(10):2285-2293. doi:10.2337/dc10-1303
- [7] Little AA, Edwards JL, Feldman EL. Diabetic neuropathies. *Pract Neurol*. 2007;7(2):82-92.
- [8] Holman N, Young RJ, Jeffcoate WJ. Variation in the recorded incidence of amputation of the lower limb in England. *Diabetologia*. 2012;55(7):1919-1925. doi:10.1007/s00125-012-2468-6.
- [9] Hsu WC, Chiu SY, Yen AM, et al. Somatic neuropathy is an independent predictor of all- and diabetes-related mortality in type 2 diabetic patients: a population-based 5-year follow-up study (KCIS No. 29). *Eur J Neurol*. 2012;19(9):1192-1198. doi:10.1111/j.1468-1331.2011.03659.x
- [10] Rice JB, Desai U, Cummings AK, Birnbaum HG, Skornicki M, Parsons NB. Burden of diabetic foot ulcers for medicare and private insurers [published correction appears in *Diabetes Care*. 2014 Sep;37(9):2660]. *Diabetes Care*. 2014;37(3):651-658. doi:10.2337/dc13-2176
- [11] Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, et al. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):42. Published 2019 Jun 13. doi:10.1038/s41572-019-0097-9.
- [12] Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Barker LE, Williamson DF. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Popul Health Metr*. 2010;8:29. Published 2010 Oct 22. doi:10.1186/1478-7954-8-29
- [13] Bril V. Electrophysiologic testing. In: Gries FA, Cameron NE, Low PA, Ziegler D. *Textbook of Diabetic Neuropathy*. Stuttgart, Germany: Thieme Medical Publishers; 2003:177-84.
- [14] Dyck PJ, Albers JW, Wolfe J, et al.; Clinical vs. Neurophysiology Trial 3 Investigators. A trial of proficiency of nerve conduction: greater standardization still needed. *Muscle Nerve* 2013;48:369–374
- [15] Malik RA, Veves A, Tesfaye S, Smith G, Cameron N, Zochodne D et al. on behalf of The Toronto Consensus Panel on Diabetic Neuropathy. Small fibre neuropathy: role in the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; 27: 678–684.
- [16] Cheng HT, Dauch JR, Porzio MT, et al. Increased axonal regeneration and swellings in intraepidermal nerve fibers characterize painful phenotypes of diabetic neuropathy. *J Pain* 2013;14:941–947
- [17] Fromy B, Lingueglia E, Sigaucho-Roussel D, Saumet JL, Lazdunski M. Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat Med* 2012;18:1205–1207

- [18] Shun CT, Chang YC, Wu HP, Hsieh SC, Lin WM, Lin YH, Tai TY, Hsieh ST. Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain*. 2004 Jul;127(Pt 7):1593-605.
- [19] Pittenger GL, Ray M, Burcus NI, McNulty P, Basta B, Vinik AI. Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes Care*. 2004;27(8):1974-1979. doi:10.2337/diacare.27.8.1974
- [20] Boucek P, Havrdova T, Voska L, Lodererova A, Saudek F, Lipar K, Janousek L, Adamec M, Sommer C. Severe depletion of intraepidermal nerve fibers in skin biopsies of pancreas transplant recipients. *Transplant Proc*. 2005 Oct;37(8):3574-5.
- [21] Smith AG, Russell J, Feldman EL, et al. Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 2006;29:1294–1299.
- [22] Lindberger M, Schröder HD, Schultzberg M, et al. Nerve fibre studies in skin biopsies in peripheral neuropathies. I. Immunohistochemical analysis of neuropeptides in diabetes mellitus. *J Neurol Sci*. 1989;93(2-3):289-296. doi:10.1016/0022-510x(89)90198-6
- [23] Levy DM, Karanth SS, Springall DR, Polak JM. Depletion of cutaneous nerves and neuropeptides in diabetes mellitus: an immunocytochemical study. *Diabetologia*. 1989;32(7):427-433. doi:10.1007/BF00271262
- [24] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-824. doi:10.1038/39807
- [25] Facer P, Casula MA, Smith GD, et al. Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy. *BMC Neurol*. 2007;7:11. Published 2007 May 23. doi:10.1186/1471-2377-7-11
- [26] Caruntu C, Negrei C, Boda D, Constantin C, Caruntu A, Neagu M. Biotechnological Advances for Diagnosis of Peripheral Diabetic Neuropathy. *Roman. Biotechnol. Lett.*, 2014, 19(6), 9846-9858.
- [27] Hoeijmakers JG, Faber CG, Lauria G, Merkies IS, Waxman SG. Small-fibre neuropathies—advances in diagnosis, pathophysiology and management. *Nat Rev Neurol* 2012;8:369-379
- [28] Caselli A, Spallone V, Marfia GA, et al. Validation of the nerve axon reflex for the assessment of small nerve fibre dysfunction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(8):927-932. doi:10.1136/jnnp.2005.069609

- [29] Krishnan ST, Quattrini C, Jeziorska M, Malik RA, Rayman G. Neurovascular factors in wound healing in the foot skin of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2007;30(12):3058-3062. doi:10.2337/dc07-1421
- [30] Krishnan ST, Quattrini C, Jeziorska M, Malik RA, Rayman G. Abnormal LDI flare but normal quantitative sensory testing and dermal nerve fiber density in patients with painful diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 2009;32(3):451-455. doi:10.2337/dc08-1453
- [31] **Ghita MA**, Caruntu C, Rosca AE, Caruntu A, Moraru L, Constantin C, Neagu M, Boda D. Real-Time Investigation of Skin Blood Flow Changes Induced by Topical Capsaicin. *Acta Dermatovenereol Croat*. 2017;25(3):223-227.
- [32] Caruntu C, Boda D. Evaluation through in vivo reflectance confocal microscopy of the cutaneous neurogenic inflammatory reaction induced by capsaicin in human subjects. *J Biomed Opt*. 2012;17(8):085003. doi:10.1117/1.JBO.17.8.085003
- [33] Parkhouse N, Le Quesne PM. Impaired neurogenic vascular response in patients with diabetes and neuropathic foot lesions. *N Engl J Med*. 1988;318(20):1306-1309. doi:10.1056/NEJM198805193182005
- [34] Caselli A, Rich J, Hanane T, Uccioli L, Veves A. Role of C-nociceptive fibers in the nerve axon reflex-related vasodilation in diabetes. *Neurology*. 2003;60(2):297-300. doi:10.1212/01.wnl.0000040250.31755.f9
- [35] Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):143-201.
- [36] Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev*. 2006;86(4):1309-1379. doi:10.1152/physrev.00026.2005
- [37] **Ghita MA**, Caruntu C, Lixandru D, Pitea A, Batani A, Boda D. The Quest for Novel Biomarkers in Early Diagnosis of Diabetic Neuropathy. *Current Proteomics*. 2017; 2017:14. doi: 10.2174/1570164614666161228122259.
- [38] Herrmann DN, Boger JN, Jansen C, Alessi-Fox C. In vivo confocal microscopy of Meissner corpuscles as a measure of sensory neuropathy. *Neurology*. 2007;69(23):2121-2127. doi:10.1212/01.wnl.0000282762.34274.94
- [39] Caruntu C, Negrei C, **Ghita MA**, Caruntu A, Badarau AI, Buraga I, Boda D, Albu A, Branisteanu D. Capsaicin, a hot topic in skin pharmacology and physiology. *inflammation*. 2015;8(40):21.

- [40] Hegyi J, Hegyi V, Messer G, Arenberger P, Ruzicka T, Berking C. Confocal laser-scanning capillaroscopy: a novel approach to the analysis of skin capillaries in vivo. *Skin Res Technol*. 2009;15(4):476-481. doi:10.1111/j.1600-0846.2009.00393.x
- [41] Batani A, Brănișteanu DE, **Ilie MA**, Boda D, Ianosi S, Ianosi G, Caruntu C. Assessment of dermal papillary and microvascular parameters in psoriasis vulgaris using in vivo reflectance confocal microscopy. *Exp Ther Med*. 2018 Feb;15(2):1241-1246. doi: 10.3892/etm.2017.5542.
- [42] **Ilie MA**, Caruntu C, Lixandru D, Tampa M, Georgescu SR, Constantin MM, Constantin C, Neagu M, Zurac SA, Boda D. In vivo confocal laser scanning microscopy imaging of skin inflammation: Clinical applications and research directions. *Exp Ther Med*. 2019 Feb;17(2):1004-1011. doi: 10.3892/etm.2018.6981.
- [43] Ianoși SL, Forsea AM, Lupu M, **Ilie MA** et al. Role of modern imaging techniques for the in vivo diagnosis of lichen planus. *Exp Ther Med*. 2019;17(2):1052-1060. doi:10.3892/etm.2018.6974
- [44] Moscarella E, González S, Agozzino M, Sánchez-Mateos JL, Panetta C, Contaldo M, Ardigò M. Pilot study on reflectance confocal microscopy imaging of lichen planus: a real-time, non-invasive aid for clinical diagnosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Oct;26(10):1258-65. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04279.x.
- [45] Ardigò M, Maliszewski I, Cota C, Scope A, Sacerdoti G, Gonzalez S, Berardesca E. Preliminary evaluation of in vivo reflectance confocal microscopy features of Discoid lupus erythematosus. *Br J Dermatol*. 2007;156(6):1196-1203. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07808.x
- [46] Ionescu AM, **Ilie MA**, Chitu V, Razvan A, Lixandru D, Tanase C, Boda D, Caruntu C, Zurac S. In vivo Diagnosis of Primary Cutaneous Amyloidosis -the Role of Reflectance Confocal Microscopy. *Diagnostics (Basel)*. 2019 Jun 27;9(3). doi: 10.3390/diagnostics9030066.
- [47] Neagu M, Caruntu C, Constantin C, et al. Chemically induced skin carcinogenesis: Updates in experimental models (Review). *Oncol Rep*. 2016;35(5):2516-2528. doi:10.3892/or.2016.4683
- [48] Neagu M, Constantin C, Dumitrascu GR, et al. Inflammation markers in cutaneous melanoma - edgy biomarkers for prognosis. *Discoveries (Craiova)*. 2015;3(1):e38. Published 2015 Mar 27. doi:10.15190/d.2015.30
- [49] **Ilie MA**, Caruntu C, Lupu M, Lixandru D, Tampa M, Georgescu SR, Bastian A, Constantin C, Neagu M, Zurac SA, Boda D. Current and future applications of confocal laser scanning microscopy imaging in skin oncology. *Oncol Lett*. 2019 May;17(5):4102-4111. doi: 10.3892/ol.2019.10066.
- [50] **Ghita MA**, Caruntu C, Rosca AE, Kaleshi H, Caruntu A, Moraru L, Docea AO, Zurac S, Boda D, Neagu M, Spandidos DA, Tsatsakis AM. Reflectance confocal microscopy and dermoscopy for in

- vivo, non-invasive skin imaging of superficial basal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2016 May;11(5):3019-3024. doi: 10.3892/ol.2016.4354.
- [51] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
- [52] Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM. Detectability of contrast agents for confocal reflectance imaging of skin and microcirculation. *J Biomed Opt.* 2004 Mar-Apr;9(2):323-31. doi: 10.1117/1.1646175.
- [53] Altintas MA, Altintas AA, Guggenheim M, Steiert AE, Aust MC, Niederbichler AD, Herold C, Vogt PM. Insight in human skin microcirculation using in vivo reflectance-mode confocal laser scanning microscopy. *J Digit Imaging.* 2010 Aug;23(4):475-81. doi: 10.1007/s10278-009-9219-3.
- [54] González S, Sackstein R, Anderson RR, Rajadhyaksha M. Real-time evidence of in vivo leukocyte trafficking in human skin by reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol.* 2001 Aug;117(2):384-6. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01420.x.
- [55] Altintas AA, Guggenheim M, Oezcelik A, Gehl B, Aust MC, Altintas MA. Local burn versus local cold induced acute effects on in vivo microcirculation and histomorphology of the human skin. *Microsc Res Tech.* 2011 Oct;74(10):963-9. doi: 10.1002/jemt.20982.
- [56] Altintas B, Altintas AA, Kraemer R, Sorg H, Vogt PM, Altintas MA. Acute effects of local cold therapy in superficial burns on pain, in vivo microcirculation, edema formation and histomorphology. *Burns.* 2014;40(5):915-921. doi:10.1016/j.burns.2013.11.023
- [57] Schmelz M, Petersen LJ. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci.* 2001;16:33-37. doi:10.1152/physiologyonline.2001.16.1.33
- [58] Nolano M, Simone DA, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T, Hazen E, Kennedy WR. Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. *Pain.* 1999;81(1-2):135-145. doi:10.1016/s0304-3959(99)00007-x
- [59] Malmberg AB, Mizisin AP, Calcutt NA, von Stein T, Robbins WR, Bley KR. Reduced heat sensitivity and epidermal nerve fiber immunostaining following single applications of a high-concentration capsaicin patch. *Pain.* 2004;111(3):360-367. doi:10.1016/j.pain.2004.07.017
- [60] **Ilie MA**, Caruntu C, Tampa M, et al. Capsaicin: Physicochemical properties, cutaneous reactions and potential applications in painful and inflammatory conditions. *Exp Ther Med.* 2019;18(2):916-925. doi:10.3892/etm.2019.7513

- [61] Rendell M, Bergman T, O'Donnell G, Drobny E, Borgos J, Bonner RF. Microvascular blood flow, volume, and velocity measured by laser Doppler techniques in IDDM. *Diabetes*. 1989;38(7):819-824. doi:10.2337/diab.38.7.819
- [62] Brahimi N, and Pascale Guitera. "Reflectance Confocal Microscopy in Pigmentary Disorders." *Pigmentary Skin Disorders*. Springer, Cham, 2018. 93-106.
- [63] Nolano M, Provitera V, Crisci C, Stancanelli A, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Santoro L. Quantification of myelinated endings and mechanoreceptors in human digital skin. *Ann Neurol*. 2003 Aug;54(2):197-205. doi: 10.1002/ana.10615.
- [64] Paré M, Elde R, Mazurkiewicz JE, Smith AM, Rice FL. The Meissner corpuscle revised: a multiafferented mechanoreceptor with nociceptor immunochemical properties. *J Neurosci*. 2001;21(18):7236-7246. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-18-07236.2001
- [65] Piccinin MA, Miao JH, Schwartz J. Histology, Meissner Corpuscle. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020
- [66] Nolano M, Provitera V, Lullo F. Meissner corpuscles and myelinated nerve fibers in human digital skin: a correlation with electrophysiological findings. *J Peripher Nerv Syst*, 2001, 6.165: 6.
- [67] Nolano M, Provitera V, Lullo F, Saltalamacchia AM, Crisci C, Lanzillo B, Santoro L. Tactile stimulation and mechanoreceptors in sensory neuropathies. *Neurological Sciences*, 2001, 22.1: S31-S36.
- [68] Nolano M, Provitera V, Crisci C, Stancanelli A, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Santoro L. Quantification of myelinated endings and mechanoreceptors in human digital skin. *Ann Neurol*. 2003 Aug;54(2):197-205. doi: 10.1002/ana.10615.
- [69] Dillon YK, Haynes J, Henneberg M. The relationship of the number of Meissner's corpuscles to dermatoglyphic characters and finger size. *J Anat*. 2001;199(Pt 5):577-584. doi:10.1046/j.1469-7580.2001.19950577.x
- [70] Creigh PD, McDermott MP, Sowden JE, Ferguson M, Herrmann DN. In-vivo reflectance confocal microscopy of Meissner's corpuscles in diabetic distal symmetric polyneuropathy. *J Neurol Sci*. 2017;378:213-219. doi:10.1016/j.jns.2017.05.025
- [71] Nolano M, Provitera V, Santoro L, et al. In vivo confocal microscopy of meissner corpuscles as a measure of sensory neuropathy. *Neurology*. 2008;71(7):536-537. doi:10.1212/01.wnl.0000324710.24747.c4

