

A diabétesz mellitusz és a COVID-19 betegség
mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti
szövődményei

Doktori (Ph.D.) - értekezés

Dr. Kölkedi Zsófia

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos
Programvezető: Prof. Dr. Vereczkei András
Témavezető: Dr. Szalai Eszter



Pécsi Tudományegyetem, OGYDHT

Pécs

2023

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	6
2.1. A COVID-19 betegség	6
2.1.1. A COVID-19 betegség szemészeti szövődményei	7
2.2. A diabétesz mellitusz	8
2.2.1. A diabétesz mellitusz szemészeti szövődményei	9
3. Célkitűzés	12
4. A vizsgálatban alkalmazott képalkotó eljárások ismertetése	14
4.1. Az optikai koherencia tomográfia (OCT)	14
4.1.1. Az OCT működési elve	14
4.1.2. Az elülső szegmentum SS-OCT	16
4.1.3. A hátsó szegmentum SS-OCT	16
4.2. Az optikai koherencia tomográfia angiográfia (OCTA).....	17
4.2.1. Az OCTA működési elve	17
4.2.2. A normál retina vaszkuláris plexusai és OCTA képe	19
4.2.3. Az OCTA leképzés közben keletkező műtermékek	21
4.3. Az in vivo konfokális mikroszkópia (IVCM)	23
4.3.1. Az IVCM működési elve	23
4.3.2. A normál humán cornea beidegzése és in vivo konfokális mikroszkópos képe..	24
5. Betegek és módszerek.....	27
5.1. Beteganyag.....	27
5.1.1. Az enyhe COVID-19 betegség mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményeinek vizsgálata.....	27
5.1.2. A szaruhártya neuroinflammatorikus eltéréseinek vizsgálata SARS-CoV-2 fertőzést követően	27
5.1.3. A diabétesz mellitusz mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményeinek vizsgálata	28
5.2. Alkalmazott vizsgálatok	29
5.2.1. A hátulsó szegmentum optikai koherencia tomográfia és OCT angiográfia vizsgálata	29
5.2.2. Az elülső szegmentum optika koherencia tomográfia vizsgálata	30

5.2.3. Az in vivo konfokális mikroszkópia (IVCM)	30
5.3. Statisztikai elemzések	32
6. Eredmények.....	33
6.1. Az enyhe COVID-19 betegség mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményeinek vizsgálata.....	33
6.2. A szaruhártya neuroinflammatorikus eltéréseinek vizsgálata SARS-CoV-2 fertőzést követően.....	38
6.3. A diabétesz mellitusz mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményeinek vizsgálata.....	43
7. Megbeszélés	50
7.1. Az enyhe COVID-19 betegség mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményei.....	50
7.2. A szaruhártya neuroinflammatorikus eltéréseinek vizsgálata SARS-CoV-2 fertőzést követően.....	53
7.3. A diabétesz mellitusz mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményeinek vizsgálata.....	56
8. Új eredmények összefoglalása.....	59
9. Irodalomjegyzék.....	61
10. Tudományos közlemények és kongresszusi előadások jegyzéke	78
11. Köszönetnyilvánítás.....	85

1. Rövidítések jegyzéke

ACD	elülső csarnok mélység (anterior chamber depth)
ACE-2	angiotenzin-konvertáló enzim-2 (angiotensin-converting enzyme-2)
AL	tengelyhossz (axial length)
CCT	centrális cornea vastagság (central corneal thickness)
COVID-19	koronavírus betegség-2019 (coronavirus disease 2019)
DC	dendritikus sejt (dendritic cell)
DCP	mély kapilláris plexus (deep capillary plexus)
DM	diabétesz mellitusz
DR	diabéteszes retinopátia
EDI-OCT	„enhanced-depth imaging”-OCT
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
FAZ	foveoláris avaszkuláris zóna
GCL	ganglionsejt-réteg (ganglion cell layer)
HbA1c	hemoglobin A1c
HRT-II RCM	Heidelberg-retinatomográf Rostock Cornea Modul
IDF	Nemzetközi Diabétesz Szövetség (International Diabetes Federation)
ILM	belső határhártya (internal limiting membrane)
INL	belső magvas réteg (inner nuclear layer)
IPL	belső plexiform réteg (inner plexiform layer)
IRMA	intraretinális mikrovaszkuláris abnormalitások
IVCM	in vivo konfokális mikroszkóp
K	keratometria
LSCM	laser-scanning konfokális mikroszkóp
LT	lencse vastagság (lens thickness)
MCP	középső kapilláris hálózat (middle capillary plexus)
MERS-CoV	közél-keleti légúti koronavírus (Middle East Respiratory Syndrome)
NPDR	non-proliferatív diabéteszes retinopátia
OCT	optikai koherencia tomográfia
OCTA	optikai koherencia tomográfia angiográfia

PAR	projekciós műtermék eltávolítás (projection artifact removal)
PCR	polimeráz-lánreakció (polymerase chain reaction)
PDR	proliferatív diabéteszes retinopátia
RNFL	retinális idegrostréteg (retinal nerve fiber layer)
RNS	ribonukleinsav
SARS-CoV	súlyos akut légzőszervi szindrómát okozó koronavírus (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus)
SARS-CoV-2	súlyos akut légzőszervi szindrómát okozó koronavírus - 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus - 2)
SCP	felszínes kapilláris hálózat (superficial capillary plexus)
SD-OCT	spectral-domain OCT
SS-OCT	swept-source OCT
T1DM	1-es típusú cukorbetegség (type 1 diabetes mellitus)
T2DM	2-es típusú cukorbetegség (type 2 diabetes mellitus)
TD-OCT	time-domain OCT
UKPDS	UK Prospective Diabetes Study
VD	vaszkuláris denzitás
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
WTW	„white-to-white” távolság

2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

2.1. A COVID-19 betegség

A koronavírusok ribonukleinsav (RNS) vírusok, melyek a Coronaviridae család egyik alcsaládjához az Orthocoronavirinae alcsaládkhoz tartoznak, mely további négy csoportra oszlik: alfa-, béta-, gamma- és deltakoronavírusok.^{1,2} Humán fertőzést okozó koronavírusokat először 1960-ben írtak le,³ a 2002-es SARS-CoV (súlyos akut légzőszervi szindrómát okozó koronavírus) járványt megelőzően általában enyhe légúti infekciót okoztak.⁴ A Kínában kitört SARS-CoV járvány 2500 megbetegedést okozott és 850 életet követelt. 2012-ben a Szaúd-Arábiában megjelenő MERS-CoV (közel-keleti légúti koronavírus) járvány közel 8000 megbetegedéssel és 750 halálessel járt.⁵ 2019. decemberben a kínai Wuhanban megszorodtak az ismeretlen eredetű pneumoniás esetek, a mintákból egy addig ismeretlen bétakoronavírus került izolálásra. Az új típusú koronavírus beazonosításával hétre emelkedett a humán patogén koronavírusok száma.⁶ A vírust súlyos akut légzőszervi szindrómát okozó koronavírus-2-nek (SARS-CoV-2), az általa okozott betegséget koronavírus betegség 2019-nek (COVID-19) nevezték el.⁷ Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) 2020. március 11-én kihirdette a COVID-19 pandémiát.⁸ A WHO adatbázisa alapján 2023. áprilisáig közel 7 millió halálesetet és 700 milliót meghaladó megbetegedést regisztráltak világszerte.⁹ A vírus mutációjával számos variáns megjelent, melyeket a görög ábécé betűivel jelölünk.¹⁰ A SARS-CoV-2 által okozott betegség a tünetek széles spektrumát okozhatja, a láztól és az enyhe megfázástól kezdve egészen a súlyos légzési elégtelenségig és a halálig.¹¹ A hospitalizált betegek harmada számol be perzisztáló, COVID-19 betegséghez kapcsolódó panaszokról, a betegek felénél pedig a kórházból történő hazabocsájtást követően is hosszan fennállnak a tünetek.¹² A SARS-CoV-2 fertőzésen átesettek gyakran beszámolnak általános (fáradtság, csökkent terhelhetőség, légszomj) és neuropszichológiai (szorongás, depresszió, distressz) tünetekről.¹³ A betegség maradványtünetei számos szervrendszert érinthetnek. Többek között kialakulhat tüdőfibrózis, kardiovaszkuláris rendellenességek, vese károsodás, neurológiai és mentális betegségek, valamint az alapbetegségek súlyosbodása, fellángolása.¹⁴ A fertőzés alatt a betegek csaknem 90%-a beszámol legalább egy neurológiai tünetről.¹⁵ Az idegrendszeri tünetek megjelenhetnek a légúti tünetek előtt, azokkal egy időben és azok lezajlása után is.¹⁶ Érintett lehet a központi és a perifériás idegrendszer, valamint a muszkuloszkeletális

rendszer is.¹⁷ A leggyakoribb neurológiai tünet az ízérzékelés és a szaglás zavara,¹⁸ gyakran előfordul fejfájás, szédülés és myalgia is. Bár kisebb számban, de súlyos neurológiai komplikációk is kialakulhatnak, mint például agyi infarktus, szinusz trombozisz, epilepszia, meningitisz és Guillain-Barré szindróma.¹⁹ Az idegrendszeri érintettség eredete lehet a központi vagy a perifériás idegrendszer direkt károsodása, a vírus antigén hatása által keltett gyulladásos válasz eredménye, valamint a fokozott véralvadás és az endotel diszfunkció.²⁰ A súlyos központi idegrendszeri történések mellett szív-érrendszeri katasztrófák is előfordulhatnak, mint miokarditisz, akut miokardiális infarktus, vénás tromboembólia és szívelégtelenség.²¹ A SARS-CoV-2 megtámadja az endotel sejteket, így mind az artériás, mind pedig a vénás oldalon mikro- és makrovaszkuláris szövődmények alakulhatnak ki.²² A fertőzés által okozott citokin vihar endotel károsító hatása a koagulációs kaskád aktivációjához, tromboembóliás szövődmények és disszeminált intravaszkuláris koagulopátia kialakulásához vezethet.²³

2.1.1. A COVID-19 betegség szemészeti szövődményei

Ismert, hogy a COVID-19 megbetegedésnek számos szemészeti szövődménye is lehet.^{24,25} A szemészeti tünetek megjelenhetnek a fertőzés alatt és azt követően is.²⁶ A leggyakoribb okuláris érintettség a conjunctivitis, mely tünettanában nem különbözik a többi vírusos kötőhártyagyulladástól.²⁷ A látást fenyegető komplikációk is kialakulhatnak, mint reaktiválódó uveitis, szemfenéki artériás vagy vénás elzáródás, retinális vérzések, gyapottépés gócok, chorioretinitis, panuveitis és scleritis.²⁶ Neurooftalmológiai kórképek is felléphetnek, mint például izolált agyideg bénulások, orbita gyulladás és nystagmus.²⁰

A szemfelszín környezeti hatások és infektív ágensek számára kitett terület. A könnyfilmnek szerepe lehet a vírus replikációban SARS-CoV-2 fertőzés esetén,²⁸ az infekcióhoz kapcsolódóan számos szemfelszíni megbetegedést leírtak.^{29,30} Az epitel sejtek, a stromális keratocyták és az endotel sejtek mellett antigén prezentáló sejteket is be lehet azonosítani az egészséges corneában, mint például a dendritikus sejtek (DC) és a makrofágok.³¹ A DC-k a csontvelőből származó antigén prezentáló sejtek heterogén csoportja, döntő szerepük van mind a humorális, mind pedig a sejtes immunválaszban.³² A corneális DC-k a bazális epitelium és a szubbazális idegi plexus szintjén helyezkednek el.³³ Fertőzés, gyulladás vagy sérülés esetén a DC-k nagy számban vándorolnak a perifériás cornea felől a szaruhártya centrális része felé.³² Kísérleti modelleken

bizonyították, hogy a gyulladás hatással van az epiteliumban fellelhető DC-k érése és fenotípus változására is.³¹

2.2. A diabétesz mellitusz

A diabétesz mellitusznak (DM) két fő formáját különböztetjük meg: az 1-es típusú (T1DM) és a 2-es típusú (T2DM) cukorbetegséget. T1DM esetén a hasnyálmirigy β sejtjeinek károsodása miatt abszolút inzulin hiány jön létre. A 2-es típusú cukorbetegséget inzulinrezisztencia, ehhez kapcsolódó relatív inzulin hiány és/vagy kóros inzulin szekréció, valamint emelkedett vércukorszint jellemzi. A T2DM a gyakoribb típus, a betegek közel 90-95%-át érinti.^{34,35}

A Nemzetközi Diabétesz Szövetség (International Diabetes Federation, IDF) adatai alapján 2021-ben a világon 537 millió, Európában 67 millió diabéteszes felnőtt (20-79 év között) élt. Kontinensünkön 11 ember közül 1 érintett a betegség által. Az IDF becslése szerint 2030-ra a diabéteszesek száma globálisan elérheti a 643 millió, 2045-re pedig a 783 millió főt. 2021-ben a diabétesz és szövődményei 6,7 millió halálesetért feleltek világszerte.³⁶ Európában az újonnan felfedezett 1-es típusú cukorbeteggek száma évente 3,4%-kal emelkedik, amennyiben ez a tendencia folytatódik, a következő 20 évben a betegség incidenciája meg fog kétszereződni.³⁷

A cukorbetegségnek lehetnek makrovaszkuláris és mikrovaszkuláris szövődményei. Az arterioszklerózis talaján kialakuló makrovaszkuláris komplikációk, mint a szívinfarktus, az agyi infarktus és a perifériás artériás megbetegedések, T2DM-ben a vezető halálokok közé tartoznak. A mikrovaszkuláris szövődmények jól ismert triásza a nefropátia, a neuropátia és a retinopátia.³⁸ Az emelkedett vércukorszint által okozott endotel diszfunkció mind a makro-, mind pedig a mikrovaszkuláris szövődmények kialakulásában kulcsfontosságú szerepet játszik. Az intravaszkuláris hiperglikémia az endotel sejtek károsodását okozza a poliol anyagcsere út, a protein kináz C útvonal és a hexózamin útvonal aktiválása, valamint a késői glikációs végtermékek felhalmozódása miatt. Mindegyik útvonal reaktív oxigén szabadgyökök termelődéséhez, a növekedési faktorok és a citokinek egyensúlyának felborulásához, valamint epigenetikai változásokhoz vezet.³⁴ A perifériás neuropátia, a retinopátia és a nefropátia T1DM és T2DM esetén is detektálható, csakúgy mint prediabétesz és metabolikus szindróma esetén.^{39,40,41} Az UKPDS („UK Prospective Diabetes Study”) és más populáció alapú vizsgálatok szerint a szigorú glikémiás kontroll és a megfelelő kardiovaszkuláris állapot

csökkentheti a DM-hez kapcsolódó komplikációk, mint a retinopátia és a neuropátia kialakulásának esélyét és hozzájárul a további morbiditás és mortalitás megelőzéshez.^{42,43}

2.2.1. A diabétesz mellitusz szemészeti szövődményei

A cukorbetegség a szem minden szövetét károsíthatja, a betegség következtében kialakulhat korai szürkehályog, retinopátia, neovaszkuláris glaukóma, optikus neuropátia, diabéteszes papillopátia, szemmozgászavar, keratopátia és száraz szem szindróma is.^{44,45} A vékonyrost polineuropátia és a retinopátia a diabétesz hosszútávú mikrovaszkuláris szövődményei közé tartoznak.⁴⁶ A diabéteszes retinopátia (DR) a DM leggyakoribb szemészeti szövődménye, társadalmunkban a vakság vezető okai közé tartozik. A 40 év feletti diabéteszes betegek között a retinopátia becsült prevalenciája 34,6%, ez világszerte 93 millió embert jelent.³⁷ Globálisan a diabéteszes retinopátiával élők száma 2020 és 2045 között becslések szerint 55,6%-kal fog emelkedni.⁴⁶ Ez a növekedés a gyors ütemben emelkedő diabéteszes populációnak tulajdonítható. Az UKPDS adatai alapján a T2DM-es betegek több mint 40%-ánál már a diagnózis felállításakor jelen van valamilyen fokú diabéteszes retinopátia, T1DM esetén a DR későbbi és akutabb komplikáció.⁴⁷ A DR kialakulásának szempontjából a legfontosabb rizikófaktor a betegség fennállás időtartama. T1DM esetén 5 év után 25%, 10 év után 60%, míg 15 év után 80% a DR kialakulásának az esélye.^{48,49} A befolyásolható rizikófaktorok közül a vércukorszintnek és a vérnyomásnak van a legnagyobb jelentősége.⁵⁰ A HbA1c célértéket 7%, bizonyos esetekben 6,5% alatt célszerű meghatározni.⁴³ Egy metaanalízis szerint a vérzsír-szint-csökkentő gyógyszerek pozitív hatást gyakorolhatnak a DR progressziójára és csökkenthetik a maculaödéma kialakulásának kockázatát.⁵¹ A diabéteszes retinopátia stádiumbeosztására az „International Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale” használatos (1. táblázat).⁵² Diabéteszes retinopátiában a kapilláris károsodás alapja a pericyták pusztulása, a bazálmembrán megvastagodása és az endotel sejt proliferáció, melyek érelzáródáshoz és a permeabilitás fokozódásához vezetnek. A pericyták hiányában meggyengült kapilláris falon kiboltosulások keletkezhetnek, ezek a mikroaneurizmák. Az érfal átteresztő képessége megnő, folyadék és lipid áramolhat a retina szövetei közé. A maculaödéma a DR bármely stádiumában megjelenhet. A non-proliferatív DR további jellegzetes tünetei az intraretinális vérzések és a vénás lefűződés. Az intraretinális mikrovaszkuláris abnormalitások arterio-venózus shuntök, megjelenésük kapilláris hipoperfúziót jelez. A kapilláris nonperfúzió oxigénhiányt, az angiogenezist serkentő faktorok felszaporodását,

majd érújdonképződést eredményez.^{53,54} Bár a DR-t alapvetően a retina mikrovaszkuláris károsodásnak tartjuk, számos tanulmány arra enged következtetni, hogy a retina neurovaszkuláris megbetegedéséről van szó. Retinális neurodegeneráció, gliózis és neuroinflammációs folyamatok azonosíthatók a látóhártyában még a vaszkuláris rendszer károsodása előtt.⁵⁵

DR súlyossági foka	Tágított pupilla mellett oftalmoszkóppal látható elváltozások
nincs látható retinopátia	nincs kóros elváltozás
enyhe NPDR	mikroaneurizmák jelenléte
középsúlyos NPDR	mikroaneurizmáknál súlyosabb, de a súlyos NPDR-nél enyhébb elváltozások
súlyos NPDR	az alábbiak közül bármelyik jelenléte PDR nélkül: <ul style="list-style-type: none"> - > 20 intraretinális vérzés mind a 4 kvadránsban - vénás lefűződések 2 vagy több kvadránsban - IRMA 1 vagy több kvadránsban
PDR	az alábbiak közül egy vagy mindkettő jelenléte: <ul style="list-style-type: none"> - neovaszkularizáció - üvegtesti/preretinális vérzés

NPDR = non-proliferatív diabéteszes retinopátia; PDR = proliferatív diabéteszes retinopátia; IRMA = intraretinális mikrovaszkuláris abnormalitások

1. táblázat. A diabéteszes retinopátia stádiumbeosztása az „International Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale” alapján

A DR jelenléte fokozott kockázatot jelent a szisztémás vaszkuláris szövődmények szempontjából is. A szemészeti vizsgálat során talált eltérések nem csak a szemgolyó, hanem az egész szervezet állapotára következtetni engednek.⁵⁶ A retinális mikrovaszkuláris károsodás szoros összefüggést mutat a diabéteszes polineuropátia súlyosságával.⁵⁷ A diabéteszes corneális neuropátia oka a tartós hiperglikémia okozta nervus trigeminus érintettség, mely a cornea beidegzésének károsodását eredményezi.⁵⁸ Az érző beidegzés sérülése az epithelium fellazulásához és lassú sebgyógyuláshoz

vezethet.⁵⁹ Bár a diabéteszes keratopátia a DM-es betegek 70%-át érinti, tünetszegény volta miatt aluldiagnostizált.⁶⁰ Tünetei közé tartozik a csökkent cornea érzékenység, a visszatérő epithelium erózió, a száraz szem és a látást is veszélyeztető neurotrófiás corneális ulceráció.⁵⁹

3. Célkitűzés

A modern szemészeti vizsgálóeljárásokkal a retina kapilláris hálózata, a choriokapilláris, a látóidegfő és a szaruhártya perifériás idegei kvalitatív és kvantitatív módon vizsgálhatók. Korábbi kutatások bizonyították, hogy *in vivo* konfokális mikroszkópiával (IVCM) a cornea sejtes elemei és a szubbazális idegrostok morfológiája eltérést mutatnak a szemfenéken látható elváltozások hiányában is, már jóval a neuropátia, a retinopátia vagy a mikroalbuminuria megjelenése előtt.^{61,62,63,64} Az IVCM alkalmas a perifériás idegek és a gyulladásos sejtek minőségi és mennyiségi elemzésére egészséges és gyulladásban lévő szaruhártya esetén is.^{62,65} Az OCT angiográfia (OCTA) a konfokális mikroszkópiához hasonlóan non-invazív eljárás, mely kontrasztanyag adása nélkül teszi láthatóvá és kvantifikálhatóvá a retinális kapilláris hálózatot és a choriokapillárisokat.⁶⁶ Az OCTA a vérerekben lévő vörösvértestek mozgását használja fel a képalkotásához a környező statikus struktúrákhoz viszonyítva. Diabéteszben a kapilláris elzáródás és nonperfúzió az egyik korai esemény, amely ischaemiához és szöveti károsodáshoz vezet.⁶⁷ A COVID-19 világjárvány következtében kialakuló multiszisztémás betegség mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szövődményeit egyre szélesebb körben tanulmányozzák.^{68,69} A kórképnek szemészeti manifesztációja, illetve részjelensége is ismert.^{24,25} Patofiziológiájukat tekintve a diabétesz és a COVID-19 betegség számos aspektusban hasonló komplikációkhoz vezethet.

Célul tűztük ki enyhe vagy tünetmentes SARS-CoV-2 fertőzésen átesett személyek corneális és retinális neurodegeneratív, valamint a látóhártya mikrovaszkuláris elváltozásainak vizsgálatát non-invazív klinikai módszerekkel, valamint az elváltozások korrelációjának tanulmányozását. Vizsgálatunk további célja volt, hogy a szaruhártya sejtes és ultrastrukturális elváltozásait tanulmányozzuk, valamint kvantifikáljuk a neuroinflammatorikus folyamatokat COVID-19 betegséget követően.

Vizsgálatsorozatunk másik célja 1-es és 2-es típusú cukorbetegség látóhártyát és szaruhártyát érintő neurodegeneratív, valamint retinális mikrovaszkuláris elváltozásainak vizsgálata non-invazív klinikai módszerekkel. Olyan biomarkerek kidolgozását tervezzük, amelyek időben jelzik a progresszív lefolyást és általuk a későbbi visszafordíthatatlan retinális és corneális szövődmények megelőzése lehetővé válik. A szemészeti manifesztáció korai észlelése terápiás jelentőségű, ezzel a későbbi morbiditás

megelőzhető. További célunk annak vizsgálata, hogy a retinális mikrovaszkuláris vagy a corneális neurodegeneratív elváltozások alakulnak ki korábban diabéteszes betegeknél.

Kutatómunka fő feltevései:

1. Igazoltan SARS-CoV-2 fertőzésen átesett betegek esetén in vivo konfokális mikroszkópiával különböző fokú idegrost morfológiai eltérések mutathatók ki, OCT angiográfia során mikrovaszkuláris elváltozások valószínűsíthetőek.
2. Az in vivo konfokális mikroszkópiával demonstrálható sejtes és idegi struktúrákat érintő elváltozások súlyossága a szaruhártyában korrelál a cukorbetegség stádiumával, valamint az egyéb klinikai szövődmények súlyosságával.
3. Az OCT angiográfiával észlelt retinális kapilláris plexus anomáliák már a diabétesz mellitusz korai stádiumában kimutathatók és az eltérések súlyossága az alapbetegség stádiumával korrelál.
4. Az in vivo konfokális mikroszkópiával detektálható elváltozásokkal egy időben, mindenféle klinikai tünet vagy jel megjelenése előtt felfedezhetőek retinális mikrovaszkuláris elváltozások, amelyek a diabéteszes retinopátia súlyosbodásával fokozódnak.

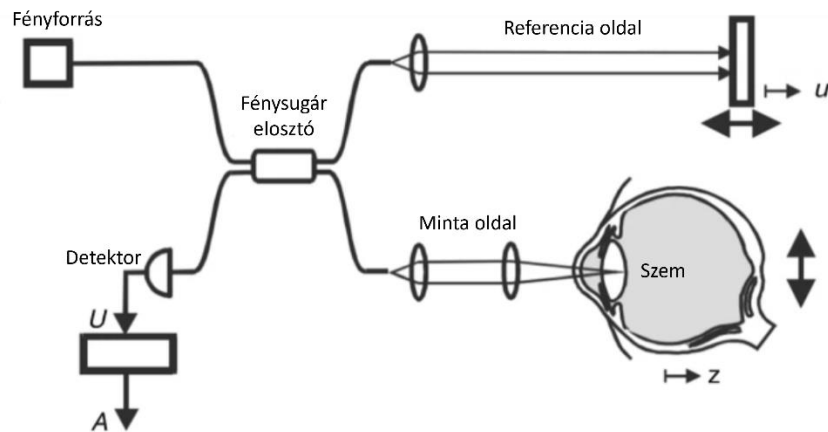
4. A vizsgálatban alkalmazott képalkotó eljárások ismertetése

4.1. Az optikai koherencia tomográfia (OCT)

4.1.1. Az OCT működési elve

Az OCT non-invazív, nagy felbontású képalkotó technológia, mely a vizsgált szövetből származó és egy referencia jel közötti interferencián alapul és valós idejű képet hoz létre.^{70,71} A vizsgálat non-kontakt, azaz direkt kontaktusra vagy közvetítő médiumra nincs szükség.⁷² Klinikai alkalmazásáról 1991-ben Huang és munkatársai számoltak be.⁷¹ Az OCT optikai biopsziaként működik, a szövetek eltávolítása nélkül nagy felbontású (1-15 μm) felvételt ad.^{72,73} Működési elve hasonlít az ultrahangéhoz, azzal a különbséggel, hogy fényt használ akusztikus hullám helyett.^{72,73} A fény a hanghullámmal összehasonlítva rövidebb hullámhosszúságú, kisebb a szöveti penetranciája, ugyanakkor nagyobb felbontású képet hoz létre. A szemészetben vizsgált struktúrák mérete miatt az alacsonyabb mértékű szöveti áthatolás nem releváns.⁷⁴

Az OCT vizsgálat során keresztmetszeti kép jön létre a szövetek fénysugárral történő pásztázása, valamint a visszaverődési idő késésnek és intenzitásának mérése folytán. Mivel a fény rendkívül nagy sebességgel halad, a visszavert fény nem mérhető közvetlenül. Az OCT működése az alacsony koherenciájú interferometria elvén alapul, a visszaverődő fény interferál egy referencia fénysugárral.^{73,75,76} Az interferencia két vagy több hullám szuperpozíciója, amelynek eredménye egy új hullámmintázat. Az OCT leképezés a Michelson-féle interferométer segítségével történik.⁷¹ A szuperlumineszcens dióda lézerekből származó fénynyaláb megvilágítja a fénysugár elosztót, majd kettéválva folytatja az útját. Az egyik fénysugár a leképezendő szövetre, a másik a referencia oldalra vetül. A mintáról visszaverődő fény interferál a referencia karral, majd egy fotodetektor érzékeli az interferométer kimeneténél. A mintáról visszaverődő fény késése és a visszavert fény intenzitása mérhető az interferencia kimenet érzékelésével (1. ábra). Az adatok logaritmikus szürke skálán vagy hamis színskálán ábrázolhatók.^{71,72} Az OCT által létrehozott kétdimenziós, keresztmetszeti B-módú képek egydimenziós, longitudinális A-módú leképezések sorozatából állnak. Az A-módú leképezéseket a szövetek optikai reflektivitása, denzitása határozza meg.⁷⁷



1. ábra. Az OCT működési elve (Forrás: Aumann S et al. Optical Coherence Tomography (OCT): Principle and Technical Realization. In: JF Bille. High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology, Springer, Heidelberg, 2019.)

Az első generációs OCT készülékek a time-domain OCT-k (TD-OCT) voltak, melyek alapját egy fényforrás és egy mozgó referencia tükör adta.⁷⁸ Az újabb generációs, gyorsabb és nagyobb felbontású OCT-k megjelenésével a TD-OCT-k kiszorultak a mindennapi klinikai gyakorlatból.

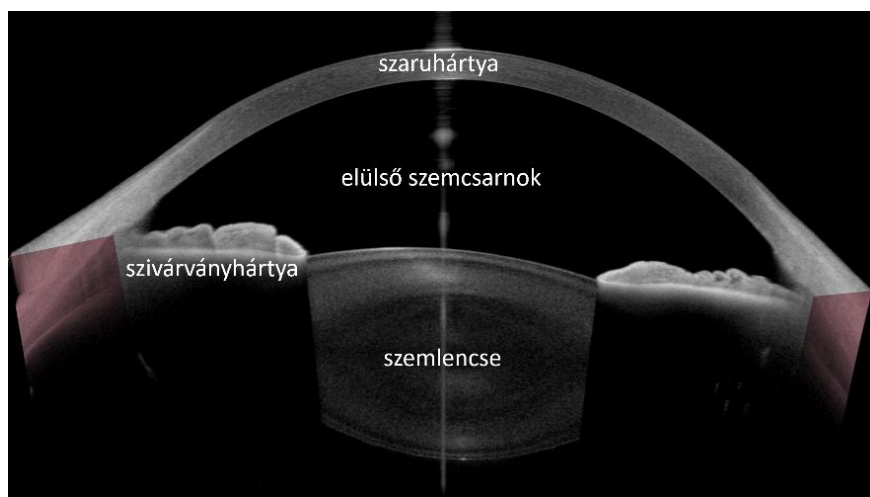
A második generációs OCT-k a Fourier-transzformáció elvén működő spectral-domain (SD) OCT-k, melyek minden visszaverődő fénycsugár szimultán érzékelnek. A mozgó referencia tükör eliminálásával az A-szkennek száma jelentősen megnő, ami gyorsabb képalkotást és nagyobb felbontóképességet eredményez.⁷⁸ Az SD-OCT-k axiális felbontóképessége 4-6 μm , míg a TD-OCT-ké 10 μm volt.^{78,79,80} Az SD-OCT továbbfejlesztett változata az „enhanced-depth imaging” (EDI) OCT, mely 500-800 μm -rel mélyebb penetrációt tesz lehetővé, így a chorioidea vizsgálatára is alkalmas.^{81,82}

Jelenleg a legmodernebb OCT készülékek a szintén Fourier domain OCT rendszerű swept-source OCT-k (SS-OCT). A SS-OCT esetén egy adott hullámhosszágú lézernyaláb rendezett módon „söpör” végig a vizsgált szöveteken. A visszaverődő fény és a referencia kar interferenciája olyan jelet eredményez, amely csaknem valós időben detektálható.⁸² Az SS-OCT-nél használt fényforrás az SD-OCT-hez képest komplexebb, a detektor viszont egyszerűbb. A hosszabb hullámhossztartomány miatt mélyebb szöveti penetráció érhető el, ennek köszönhetően a vitreoretinális határfelszín és a chorioidea is leképezhető.⁸² A SS-OCT az előző generációs készülékekhez képest nagyobb sebességgel működik, másodpercenként 100.000-400.000 axiális szkent készít, axiális

felbontóképessége 8 μm . A készülék alkalmas az elülső és a hátsó szegmentum nagy felbontású, gyors leképezésére.^{83,84} A SS-OCT fő hátránya az SD-OCT-hez képest, hogy a laterális felbontó képessége kisebb a hosszabb hullámhossz miatt, azonban a különbség nem számottevő (5 vs. 7 μm).⁸⁵

4.1.2. Az elülső szegmentum SS-OCT

Az OCT technológiát eredetileg a hátsó szegmentum leképezésére alkalmazták, a technika tovább fejlődésével alkalmassá vált a szemfelszín és az elülső szegmentum vizsgálatára is (2. ábra). A hosszú hullámhosszúságú fény és a SS-technológia kombinációja lehetővé teszi az elülső szegmentum, mint a szaruhártya, az elülső szemcsarnok, az írisz és a szemlencse vizsgálatát, valamint a szem tengelyhosszának lemérését is. Számos szemészetben releváns paraméter elemzését teszik lehetővé a kapott eredmények. Ilyenek a szaruhártya topográfia és tomográfia, az elülső szegmentum elemzése, a biometria és a műlencse tervezés.^{86,87}

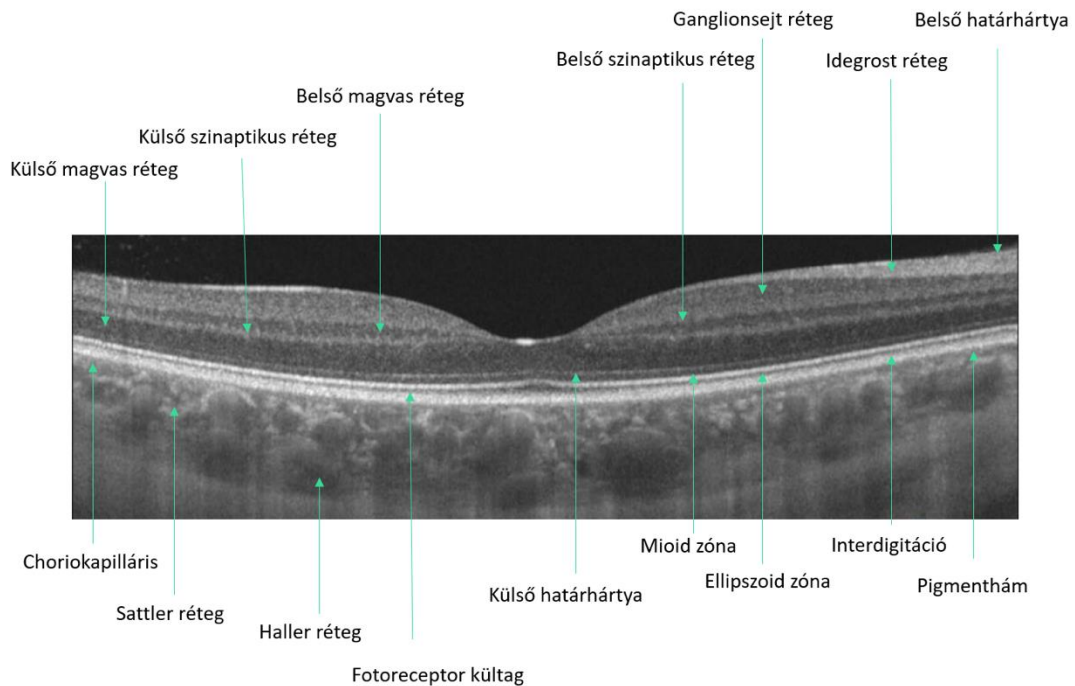


2. ábra. Ép elülső szegmentum SS-OCT képe (saját ábra).

4.1.3. A hátsó szegmentum SS-OCT

A hátsó szegmentum OCT szövettani feldolgozáshoz mérhető felbontású képalkotásra képes a retináról és a látóidegfőről, megjelenése mérföldkőnek számít a szemészeti diagnosztikában (3. ábra). A SS-OCT nagyobb hullámhosszúságú vizsgálófényvel dolgozik (1040-1060 nm), mint az SD-OCT (840 nm), ennek köszönhetően a töröközegi

borúságokban kisebb az elnyelődés, valamint nagyobb a szöveti penetráció.⁸⁸ A SS-OCT alkalmas az üvegtest, a retina és a chorioidea szimultán vizsgálatára. A nagyobb képalkotási sebesség miatt a műtermékek száma alacsonyabb.⁸⁹



3. ábra. Ép macula SS-OCT képe (saját ábra).

4.2. Az optikai koherencia tomográfia angiográfia (OCTA)

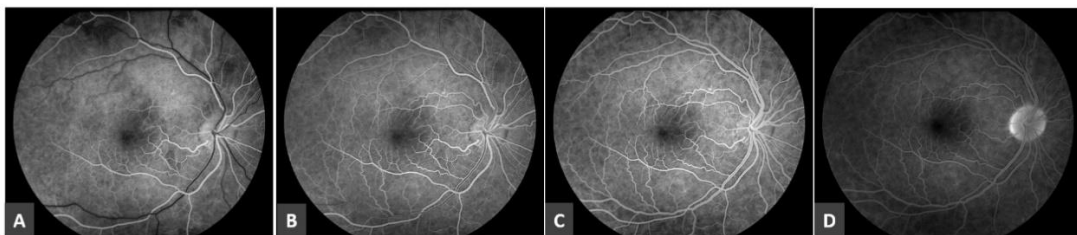
4.2.1. Az OCTA működési elve

Az OCT angiográfia az egyetlen vizsgáló eljárás, mely a retina kapilláris hálózatának és a choriokapilláris non-invazív ábrázolására alkalmas, az OCT szoftveres továbbfejlesztésének az eredménye. Az OCTA a mozgáskontraszt elvén működik, egy adott területről egymást követően több B-módú OCT felvétel készül. A retinában csak a vörösvértestek mozdulnak el, így a reflektivitás időbeli változásának detektálásával az erek kirajzolhatók.^{66,90,91}

Az egyes képek közötti változás elemzésére, így az áramlás detektálására, számos lehetőség áll rendelkezésre.⁹² A Fourier transzformációt követően az OCT jel amplitúdó

és fázis információt tartalmaz. A OCT szignál feldolgozása alapján 3 fő OCTA típust különböztetünk meg: az amplitúdó-jel alapú, a fázis-jel alapú és a komplex-jel alapú OCTA-t.⁹³ Az amplitúdó-jel alapú leképzés esetén a szignál amplitúdójában történő változások elemzése által rajzolódik ki az áramlás, ebben az esetben a fázis információk nem lesznek figyelembe véve.⁹⁴ A mozgáskontraszt érzékelésének másik lehetséges módja a fény fázis változásainak érzékelése, az úgynevezett fázis-jel alapú leképzés. A vörösvértestek mozgása a visszaverődő fényben fázis változást indukál, mely eltérés mérhető. Mindig jelen van reziduális mozgás is, azonban ez igen alacsony, míg a vér mozgása által okozott variancia sokkal magasabb.⁹² A fázis és az amplitúdó jel változások egyidejű követésével hibrid technika jön létre, mellyel mindkét eljárás előnye kihasználható és elkerülhetők az egyes eljárásokból adódó hátrányok.⁹²

Az OCTA megjelenését megelőzően a retina és a chorioidea ereinek vizsgálatára az invazív fluoreszcein (FLAG) (4. ábra) és indocianin zöld angiográfia (ICG) állt rendelkezésre, melyekkel intravénás festék beadását követően a véráramlás dinamikus, kétdimenziós ábrázolására volt lehetséges.⁹¹ Az OCTA legnagyobb előnye az érfestéses vizsgálattal szemben, hogy gyors és ismételhető módon, festék beadása nélkül jön létre a képalkotás, így elkerülhető az esetleges allergiás reakció.⁹⁵ Az OCT angiográfia további előnye, hogy az egyes kapilláris hálózatok külön-külön is vizsgálhatók, az „en face” felvételeken a membrana limitans internától a choriokapillárisig elkülönítve végig pásztázhatók az érhálózatok.⁹¹ Az OCTA hátránya, hogy a dinamikus változások, mint a szivárgás és a festődés nem jeleníthetők meg, valamint nem képes ábrázolni a lassú vérátáramlású területeket, így a mikroaneurizmák egy része nem jeleníthető meg a felvételeken. ⁹⁶ Túl lassú vagy turbulens áramlás esetén nem jön létre dekkorrelációs jel. A véráramlás ábrázolását nagymértékben meghatározza az egyes felvételek között eltelt idő, hosszú interszken idő esetén az igen lassú áramlás is detektálható.⁹⁷

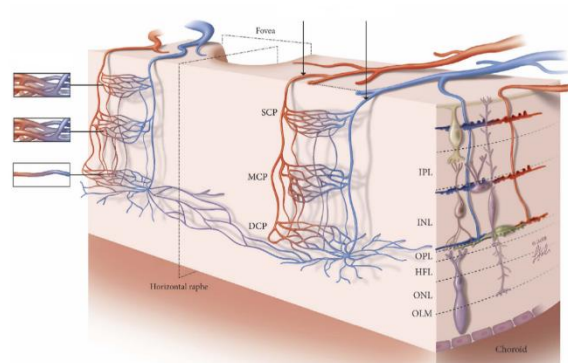


4. ábra. Ép szemfenék fluoreszcein angiográfias képe (saját ábra). A: Artériás fázis, B: Korai vénás fázis, C: Késői vénás fázis, D: Recirkulációs fázis

4.2.2. A normál retina vaszkuláris plexusai és OCTA képe

A szem vérellátásáért az artéria carotis internából eredő arteria ophthalmica felelős.⁹⁸ A retina az emberi test legnagyobb metabolikus aktivitással rendelkező szövete, vérellátását két vaszkuláris rendszer biztosítja. Az arteria centralis retinae a belső retina, míg a choriokapilláris a retinális pigmentepitel és a külső retina vérellátásáért felelős. Az arteria centralis retinae az orbitacsúcban az arteria ophthalmicából ered, majd a látóideg mentén halad a szemgolyó felé, a bulbus mögött 1 cm-rel belép nervus opticus állományába, majd intraoculárisan 2 nazális és 2 temporális ágra oszlik.⁹⁹ A retina külső rétege a chorioikapilláris felől, diffúzió útján táplálkozik. A chorioidea vérellátása szintén az arteria ophthalmicából származik a rövid és hosszú ciliaris arteriolák útján.¹⁰⁰

A retinában négy vertikális kapilláris hálózat található.^{101,102} A felszínes kapilláris plexus (SCP) a ganglionsejt rétegben helyezkedik el és közvetlenül az arteria centralis retinae-ből származik. A szuperficiális vaszkuláris hálózat alatt két mélyebb kapilláris hálózat található. A belső plexiform és a belső magvas réteg határán a középső kapilláris hálózat (MCP), a belső magvas és a külső plexiform réteg találkozásánál pedig a mély kapilláris plexus (DCP) (5. ábra).¹⁰³ Vérellátásukat vertikális anasztomózisokon keresztül a felszínes kapilláris hálózatból nyerik.^{104,105} A látóidegfő körül található a negyedik kapilláris plexus, a radiális peripapilláris kapilláris hálózat, mely az idegrostrétegben párhuzamosan fut az axonokkal.¹⁰⁶ Nesper és munkatársai kutatásai alapján a parafoveális területen mind a három kapilláris hálózat saját tápláló arteriolával és elvezető venulával rendelkezik, az egyes kapilláris hálózatokat anasztomózisok kötik össze.¹⁰⁷ A foveánál a retina vaszkuláris plexusai gyűrűt alkotva egy avaszkuláris területet határolnak körül, ezt hívjuk foveoláris avaszkuláris zónának (FAZ).¹⁰³ A látóhártyában a FAZ területén a legmagasabb a fotoreceptorok sűrűsége, mivel ez a terület felelős az éleslátásért.¹⁰⁸

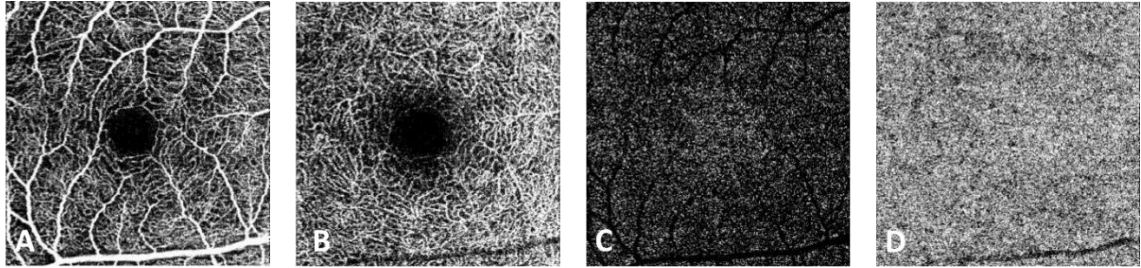


SCP=szuperficiális kapillaris hálózat; MCP=középső kapillaris hálózat; DCP= mély kapillaris hálózat; IPL= belső plexiform réteg; INL=belső magvas réteg; OPL=külső plexiform réteg; HFL= Henle réteg; ONL=külső magvas réteg; OLM=membrana limitans externa;

5. ábra. Retina parafoveális régiójának kapillaris hálózatai. (Forrás: Nesper PL, Fawzi AA. Human parafoveal capillary vascular anatomy and connectivity revealed by optical coherence tomography angiography. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018;59:3858-3867)

Az OCTA készülékek a struktúrák szegmentálásához anatómiai referencia síkokat használnak, mint például a membrana limitans interna és a Bruch membrán.^{109,110} A jelenleg elérhető OCTA készülékek többsége az alábbi négy rétegről nyújt információt:¹¹¹

- felszínes kapillaris hálózat (6. A ábra): a ganglionsejt rétegben található kapillaris hálózat (SCP)
- mély kapillaris hálózat (6. B ábra): a belső plexiform réteg külső határa és a külső plexiform réteg középpontja közötti terület (MCP+DCP)
- külső retina (6. C ábra): érmentes terület
- choriokapillaris (6. D ábra): a retinális pigmentepitel alatti terület



6. ábra. Ép macula OCT angiográfias képe (saját ábra). A: Szuperficiális kapillaris hálózat, B: Mély kapillaris hálózat, C: Külső retina, D: Choriokapillaris

4.2.3. Az OCTA leképzés közben keletkező műtermékek

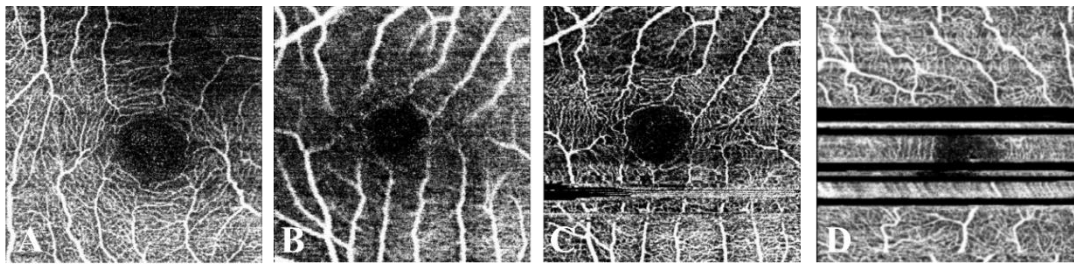
Az OCTA felvételeken jelentkező artefaktok számos technikai és klinikai okból létrejöhetnek: az OCT képek készítésének és feldolgozásának módja következtében, a vizsgált szem tulajdonságai miatt, a szemmozgások által, valamint az OCT felvételek angiográfias képpé való átalakítása közben.⁹²

Alacsony jelerősségből adódó műtermékek: Számos okból kialakulhat alacsony jelerősség, mint például a szivárványhártya árnyékoló hatása nem megfelelően tág pupilla esetén, a töröközegi borúságok, az intraretinális vagy a szubretinális folyadék, a vérzés, az erek árnyékoló hatása vagy a pigmenthám összezsugorodása (7. A, B ábra).^{112,113}

Projekciós artefaktok: Az OCTA képalkotás az azonos pozícióból visszaverődő fény reflektivitásának változásán alapul, mely eltérés az erekben mozgó vörösvértesteknek tulajdonítható. Az éren keresztül haladó fény tévesen áramlásnak érzékelhető, ha az alatta lévő területről visszaverődik.⁹² Tehát a projekciós artefakt tévesen detektált áramlás a mélyebb rétegekben.¹¹⁴ Projekciós műtermékre utal, ha a mély kapillaris hálózatban a felszínes kapillaris hálózattal megegyező mintázat ábrázolódik.¹¹⁵ A legújabb, úgynevezett PAR (projection artifact removal) szoftverekkel a projekciós műtermékek eredményesen eltávolíthatók. A módosítás következtében alakulnak ki az úgynevezett „projection removal” artefaktok. Ebben az esetben áramlási hiány látható a mélyebb rétegekben a rávetülő erek kivonásának lokalizációjában.¹¹⁵

Szegmentációs hibák: Az OCTA en-face felvételeken a retina különböző szeleteinek mikrovaskuláris hálózata ábrázolódik. A szeletek a retina meghatározott rétegei által határolt területek.¹¹⁶ Minden hiba, ami az egyes rétegek beazonosításakor történik, szegmentációs hibához vezet. A szegmentációs hibák gyakoribbak rossz képminőség és retinális patológia jelenléte esetén.¹¹⁷

Mozgási műtermékek: Az OCTA képalkotás közben ugyanarról a területről egymás után több B-módú felvétel készül, így a felvételek érzékenyek mind az axiális, mind a transzverzális mozgásokra. A légzéssel együtt járó apró elmozdulások vagy a szem szakkadikus elmozdulásai is mozgási műterméket eredményezhetnek, ezek egy részét a készülék beépítette szoftvere kompenzálni képes.⁹³ Jellegzetes mozgási műterméket okoz a pislogás. Információ veszteséssel jár, a felvételeken fekete sávként jelentkezik (7. D ábra).¹¹²



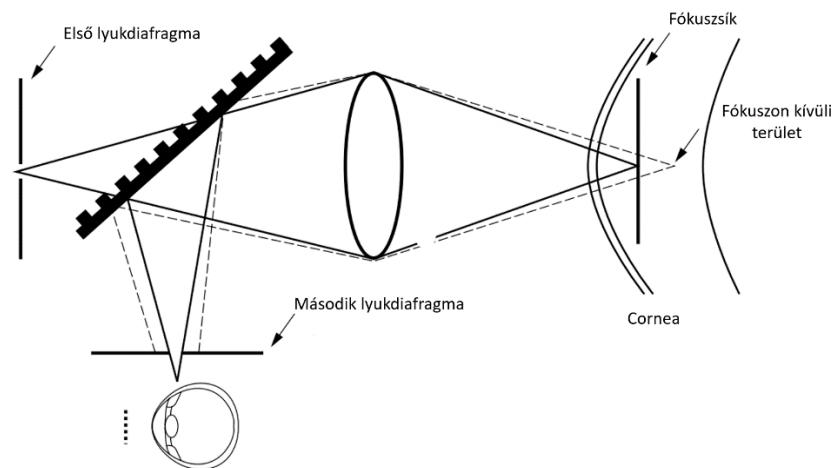
7. ábra. Műtermékek a felszínes kapilláris hálózatról készült OCTA felvételeken (saját ábra). Hátsó kérgi cataracta árnyékoló hatása (A). Száraz szemfelszín okozta jelerősség csökkenés (B). Szakkadikus szemmozgások hatására létrejövő mozgási műtermék (C). Pislogás hatására létrejövő mozgási műtermék (D).

4.3. Az in vivo konfokális mikroszkópia (IVCM)

4.3.1. Az IVCM működési elve

Az in vivo konfokális mikroszkópiás vizsgálat során az „optikai szelelelés” módszerével a cornea élőben, non-invazív módon vizsgálható, a szaruhártyáról sejtszintű „en face” biomikroszkópos felvételek készíthetők.¹¹⁸ A konfokális mikroszkópia alapjait 1957-ben Minsky fektette le.¹¹⁹ Hagyományos fénymikroszkóp esetén a kép zajos a fókuszsíkon kívüli struktúrákról visszaverődő és szóródó fény miatt.¹²⁰ A konfokális mikroszkóp a fókuszon kívüli területről érkező fénysugarakat eliminálja, így a felbontás számottevően javul.¹²¹

A konfokális mikroszkópia során a fényforrásból érkező fénysugár egy lyukdiafragmán halad át, majd egy objektív lencse segítségével a mintában fókuszálódik. A mintából visszavert fénysugarak az objektíven keresztül egy detektor rendszeren képződnek le, annak lyukdiafragmáján áthaladva. A beeső és a visszavert fénysugarakat ugyanaz az objektív fókuszálja, ez biztosítja a megvilágítás és a leképezés azonos fókuszúságát, a konfokalitást (8. ábra). A fókusz sík helyzetét változtatva lehetővé válik a különböző mélységben lévő struktúrák vizsgálata.¹²²



8. ábra. Az IVCM működési elve (Forrás: Jalbert I et al. In vivo confocal microscopy of the human cornea. Br J Ophthalmol. 2003;87:225-36.)

A humán corneáról először 1989-ben készült konfokális mikroszkópos felvétel.¹²⁰ A konfokális képalkotás a réslámpa biomikroszkópiához képest lényegesen nagyobb optikai

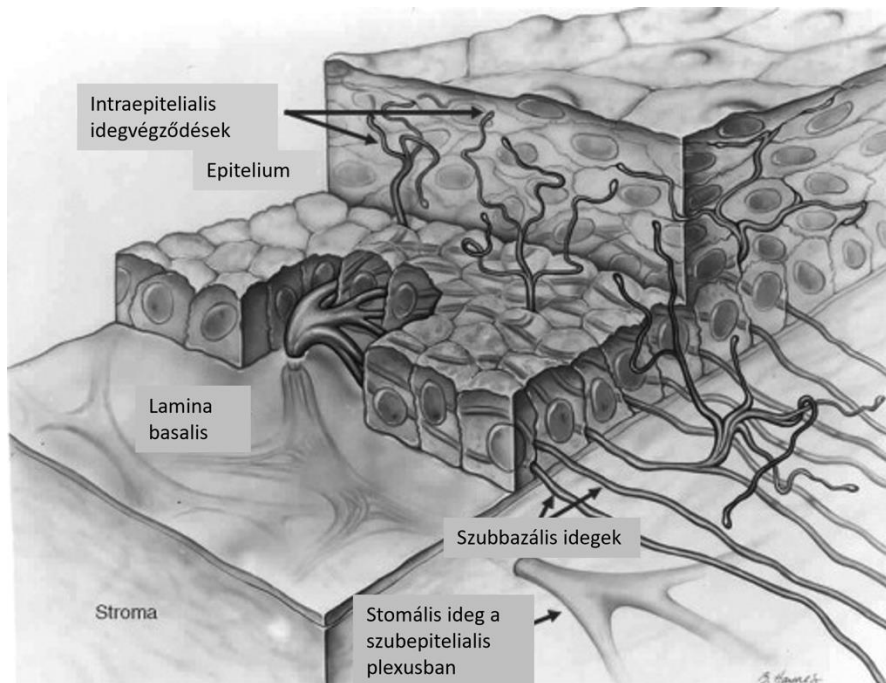
felbontóképességet biztosít.¹²³ Működésük alapján a konfokális mikroszkópoknak három típusát különböztetjük meg. A tandem-scanning konfokális mikroszkóp alapja a Nipkow-korong, egy forgó korong, melyen spirál alakban helyezkednek el a lyukdiafragmák. A készülék valós idejű és színű leképzést biztosít, hátránya az igen alacsony fényáteresztőképesség, mely rossz képminőséget eredményez.¹²³ A slit-scanning konfokális mikroszkóp esetén a párhuzamos megvilágítás és leképzés a képalkotás sebességét megnöveli, ez azonban a képfelbontás csökkenését eredményezi.¹²⁴

A laser-scanning konfokális mikroszkóp (LSCM) koherens fényforrást használ.¹²¹ A 2002-ben kifejlesztett Heidelberg-retinatomográf Rostock Cornea Modul (HRT RCM) az egyetlen szaruhártya vizsgálatra alkalmas, a mindennapi gyakorlatban is használható LSCM.^{125,126} A készülék alapja a látóidegfő és a retina vizsgálatára kifejlesztett scanning laser ophthalmoscop, a Heidelberg-retinatomográf, melyhez hozzá illeszkedik a Rostock Cornea Modul. A HRT RCM raszter mintában pásztázza le a vizsgált területet, a használt dióda lézer hullámhossza 670 nm.¹²⁶ A készülék laterális felbontóképessége 1-2 μm közötti, az axiális felbontóképessége 4 μm körüli.¹²³

4.3.2. A normál humán cornea beidegzése és in vivo konfokális mikroszkópos képe

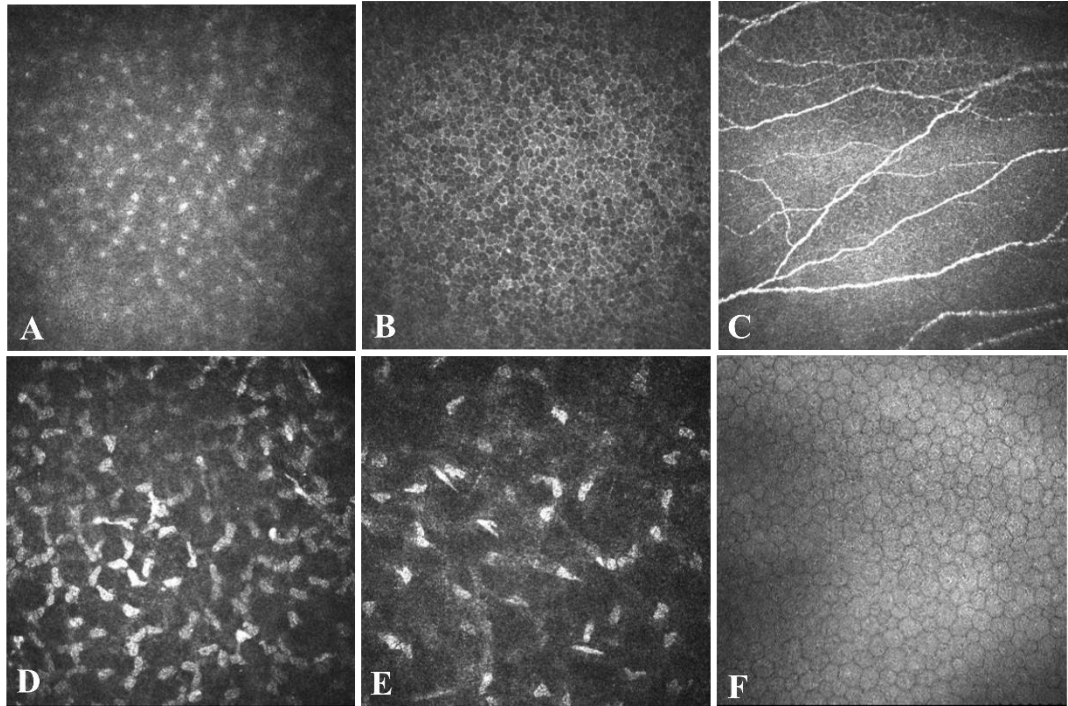
A szaruhártya beidegzése főként szenzoros, a corneát ellátó idegrostok a nervus trigeminus nervus ophthalmicus ágából származnak.¹²⁷ Az idegrostok a periférián, a cornea felszínével párhuzamosan lépnek a szaruhártya állományába, majd a limbustól 1 mm-re elvesztik a myelin borításukat, ezt követően számos kisebb ágra oszlanak. A myelin borítás hiányának a cornea transzparenciája miatt van jelentősége. A stromális idegek zöme a stroma elülső részében helyezkedik el.⁹⁸ A stromában az idegrostok 90°-kal elfordulva a cornea felszíne felé haladnak, a Bowman membránt átfúrják, majd ismét 90°-kal elfordulva a szaruhártya felszínével párhuzamosan futnak tovább a Bowman membrán és a bazális epitel sejtsor között a szubbazális idegi plexust alkotva.¹²⁸ A szubbazális idegi plexusban 5000-7000, egymással párhuzamosan futó idegrost található, melyek számos elágazódást adnak. In vivo konfokális mikroszkóppal megfigyelhető, hogy a szubbazális idegi plexusban az idegrostok spirál alakot formálnak, melynek a centrumát vortexnek hívjuk. A szubbazális plexusból az egyes idegrostok vertikális irányba fordulnak, rövid, vékony idegvégződéseket alkotva az epitel sejtek között (9. ábra).¹²⁹ A szaruhártya az emberi test egyik leggazdagabban innervált szövete,

négyzetmilliméterenként megközelítőleg 7000 szabad, epiteliális idegvégződést tartalmaz.¹²⁸



9. ábra. A cornea beidegzése (Forrás: Corneal nerves: Anatomy, C.F. Marfurt, Encyclopedia of the eye, 2010)

Az IVCM felvételeken a szaruhártya felszínes epitelsejt rétegét sokszögletű sejtek, az intermedier epitelsejteket hiperreflektív sejtmagok jellemzik (10. A ábra).¹²¹ A bazális epitelsejtek a szaruhártya hám rétegének legkisebb sejtjei, melyek szabályos mozaikként, sötét sejttesttel és világos szegéllyel jelennek meg (10. B ábra) az in vivo konfokális mikroszkópos képeken. A szubbazális idegi plexus (10. C ábra) a Bowman membrán és a bazális epitélium között helyezkedik el, homogén reflektivitású, vonalas struktúráként ábrázolódik.¹¹⁸ Az elülső stroma keratocyták jól definiált, világos, kerekded objektumokként látszanak (10. D ábra). A hátsó stroma keratocyták megnyúltabbak, kevésbé reflektívek (10. E ábra). Az endotelsejt réteget szabályos, egysoros hexagonális sejtek alkotják világos sejttesttel és sötét szegéllyel (10. F ábra).¹¹⁸



10. ábra. Az ép cornea in vivo konfokális mikroszkópos képe (saját ábra). A: Intermedier epitelsejtek, B: Bazális epitelsejtek C: Szubbazális idegi plexus, D: Elülső stroma, E: Hátsó stroma, F: Endotel sejtek

5. Betegek és módszerek

A vizsgálati alanyok beválogatását és kivizsgálását a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Szemészeti Klinikáján végeztük a fent részletezett diagnosztikai modalitásokkal, prospektív módon. A diabéteszes csoportban az egészségügyi betegnyilvántartó rendszerből (e-MedSolution és Elektronikus Egészségügyi Szolgáltatási Tér) az alapbetegség súlyosságát jellemző laborparaméterek is kigyűjtésre és elemzésre kerültek. A vizsgálatokra a résztvevők tájékozott, írásos hozzájárulását követően került sor.

Eredményeink adatelemzése során a beteg adatokat anonimizáltuk és kódolás után az adatokat egy, csupán a kutatásban résztvevők által hozzáférhető adatbázisban tároltuk.

A felsorolt vizsgálatok módszertana az irodalomban leírtaknak megfelel, a kutatási terv összeállítása a hatályos jogszabályoknak és a Helsinkai Deklarációban megfogalmazottaknak megfelelően történt. A betegek bevonása tájékozott beleegyezés után, a Regionális Kutatás Etikai Bizottság engedélyével történt. (Ügyiratszámok: 8433-PTE 2020., 8672-PTE 2021.)

5.1. Beteganyag

5.1.1. Az enyhe COVID-19 betegség mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményeinek vizsgálata

Vizsgálatunkat 63 egyénen végeztük el. Harmincöt, PCR (polimeráz-láncreakció) - teszttel igazolt, kórházi kezelést nem igénylő, enyhe vagy tünetmentes SARS-CoV-2 fertőzéssel átesett beteget és 28 egészséges kontrollt vontunk be a kutatásba. A vizsgálatba bevont személyek COVID-19 betegség elleni vakcinálásban nem részesültek. Az egészséges csoportba beválasztottak anamnézisében nem szerepelt jelenleg zajló vagy krónikus szisztémás és szemészeti megbetegedés. Mindkét csoportban kizáró tényező volt a kontaktlencse viselés és a szemsebészeti beavatkozás.

5.1.2. A szaruhártya neuroinflammatorikus eltéréseinek vizsgálata SARS-CoV-2 fertőzést követően

Tanulmányunkba 71 személyt vontunk be, 30 PCR - teszttel igazolt, enyhe SARS-CoV-2 fertőzést átesett és 41 korazonos egészséges egyént. COVID-19 betegség elleni

oltásban egyik csoport résztvevői sem részesültek. A kontroll csoportba beválasztottak szisztémás betegségben nem szenvedtek. A COVID-19 csoportban kizáró tényező volt a fertőzést megelőző általános megbetegedés, beleértve a metabolikus vagy a kardiovaszkuláris megbetegedést is. Egyik csoport résztvevőinek anamnézisében sem szerepelt jelenleg zajló vagy korábbi szemészeti megbetegedés, kontaktlencse viselés vagy szemmegnyitó műtét.

5.1.3. A diabétesz mellitusz mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményeinek vizsgálata

A vizsgálatba 52 diabéteszes személyt, köztük 10 T1DM-es és 42 T2DM-es, valamint 35 egészséges kontrollt vontunk be. A beválasztott egyének anamnézisében nem szerepelt szemészeti műtét, trauma, 3 dioptriát meghaladó szférikus vagy cilinderes fénytörési hiba, valamint jelenleg zajló vagy korábbi szemészeti megbetegedés. A diabéteszes csoportban enyhe NPDR megengedett volt, a maculaödémás betegeket kizártuk a vizsgálatból. Az egészséges csoportban kizáró tényező volt a jelenleg zajló vagy krónikus szisztémás megbetegedés jelenléte.

A diabéteszes retinopátia stádiumának meghatározására az „International Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale” -t használtuk (1.táblázat).⁵²

5.2. Alkalmazott vizsgálatok

A vizsgálati protokoll mindegyik vizsgálatban magába foglalta a látóélesség meghatározását, a réslámpás vizsgálatot, az indirekt oftalmoszkópiát, a szemnyomás-mérést, a szemfelszín, valamint a szemfenék képképző vizsgálatait (pupillatágításban), úgymint in vivo konfokális mikroszkópia, elülső és hátulsó szegmentum OCT, OCT angiográfia és színes fundus fotó. A méréseket minden vizsgálatba bevont egyén mindkét szemén elvégeztük, majd a random módon kiválasztott szem adatait elemeztük.

5.2.1. A hátulsó szegmentum optikai koherencia tomográfia és OCT angiográfia vizsgálata

SS-OCT és SS-OCT angiográfias (DRI OCT Triton Plus, Topcon, Tokió, Japán) vizsgálatokat végeztünk a látóidegfő, a retina és a chorioidea strukturális szerkezetének, valamint a látóhártya felszínes és mély kapilláris hálózatának non-invazív leképezéséhez. Minden OCT és OCTA vizsgálatot jól képzett vizsgáló végzett. Pupillatágítást követően minden vizsgált szemről 3x3 mm nagyságú, foveára centrált, 320x320 A-szkent tartalmazó OCT angiográfias felvétel készült. A rossz minőségű OCTA képeket és a mozgási artefaktot tartalmazó felvételeket kizártuk a vizsgálatból. A retinális érhálózat kvantitatív elemzéséhez és a rétegek szegmentálásához a berendezés beépített szoftverét (IMAGeNet 6 Version 1.26.16898, Topcon) alkalmaztuk. A felszínes kapilláris hálózat mérése a membrana limitans interna (ILM) alatt 2,6 μm -re kezdődő és a belső plexiform réteg (IPL) és a belső magvas réteg (INL) határa alatt 15,6 μm -re végződő, a mély kapilláris hálózat mérése az IPL/INL határ alatt 15,6 μm -re kezdődő és a 70,2 μm -re végződő rétegben történt. A vaszkuláris denzitást (VD) automatizáltan, az IMAGeNet szoftver segítségével határoztuk meg. Az érsűrűséget az ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study) rács két belső gyűrűjében, négy kvadránsban (felső, alsó, nazális, temporális) és a centrumban mértük. Az OCTA képek analízisét két tapasztalt vizsgáló tekintette át. A foveoláris avaszkuláris zóna (FAZ) körbe rajzolása manuálisan történt, ugyanazon gyakorlott vizsgáló által. A FAZ határának kijelölését követően a készülék μm^2 -ben megadta a terület nagyságát.

A sárgafolt és a látóidegfő strukturális vizsgálatához az OCT készülék maculára centrált SMARTTrack HD Raster (6,0x6,0 mm), és a papillára centrált 3D Disc (6,0x6,0) programját használtuk. Az átlagos retinális idegrostréteg (RNFL) vastagságot a

látóidegfőre centrált, 3,4 mm sugarú körben a készülék beépített szoftvere segítségével határoztuk meg a 3D Disc felvételeken. Az RNFL mérése a membrana limitans interna és az RNFL – ganglionsejt réteg határ között történt. A maculára centrált HD Raster felvételeken az automatikusan szegmentált vastagsági térkép felhasználásával a ganglionsejt-komplex, a centrális retina és a centrális chorioidea vastagságát értékeltük. A chorioidea vastagságát a Bruch membrán és a chorioideo-sclerális határfelszín között, a retina vastagságát az ILM és a retinális pigmentepitélium között vizsgáltuk a centrális 1 mm átmérőjű körben. A GCL (ganglionsejt-réteg) tekintetében két paramétert is rögzítettünk: a GCL+ mérése a RNFL/GCL határ és az IPL/INL határ között, a GCL++ mérése az ILM és IPL/INL határ között történt. A mérések non-invazív, non-kontakt módon történtek.

5.2.2. Az elülső szegmentum optika koherencia tomográfia vizsgálata

Az elülső szegmentum SS-OCT (Anterion, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Németország) segítségével méréseket végeztünk a szem biometrikus adatainak feltérképezésére. Vizsgáltuk a szaruhártya elülső felszínének törőerejét (keratometria, K), az astigmat, a cornea centrális vastagságát (central corneal thickness, CCT), az elülső szemcsarnok mélységét (anterior chamber depth, ACD), a „white-to-white” távolságot (WTW), a szemlencse vastagságát (lens thickness, LT) és a szemgolyó tengelyhosszát (axial length, AL) a berendezés „Cataract App” programjával. A mérések non-invazív, non-kontakt módon történtek.

5.2.3. Az in vivo konfokális mikroszkópia (IVCM)

A corneális sejtrétegek és a szaruhártya szubbazális idegrostjainak vizsgálatát in vivo konfokális mikroszkóppal (Heidelberg Retina Tomograph II Rostock Cornea Module, Heidelberg Engineering, Németország) végeztük. A konfokális mikroszkópia helyi érzéstelenítésben (oxybuprocaine 0,4%) történt, a betegek számára fájdalommal nem járt. A készülék objektív lencséje elé egyszer használatos, steril, viszkózus Vidisic géllal (Bausch and Lomb, Berlin, Németország) töltött polimetil-metakrilát kupakot (Tomocap, Heidelberg Engineering) helyeztünk.

A szubbazális plexusról minden vizsgált szem esetében három jó minőségű képet elemeztünk az ACCMetrics szoftver V3 (University of Manchester, Manchester, Egyesült Királyság) segítségével a corneális idegek kvantifikálásához.^{130,131,132,133,134,135}

A szoftver automatikusan kijelöli az idegrostokat (piros), az idegrost ágakat (kék) és az elágazódási pontokat (zöld) (12. ábra). A sejtszámláláshoz a konfokális mikroszkóp beépített szoftverét alkalmaztuk. A cornea szubbazális idegrostjaival kapcsolatban vizsgáltuk a corneális szubbazális idegrost denzitást, azaz az 1 mm²-re eső idegrostok számát (No/mm²), az idegrost elágazódás denzitást, azaz a fő idegroston az 1 mm²-re eső elsődleges elágazódási pontok számát (No/mm²), az idegrost hosszt, azaz az 1 mm²-re eső teljes idegrost hosszt (mm/mm²), a teljes idegrost elágazódás denzitást, azaz az 1 mm²-re eső elágazódási pontok számát (No/mm²), az idegrost területet, azaz az 1 mm²-re eső idegrostok területét (mm²/mm²), valamint az idegrost szélességet, azaz 1 mm²-nyi területen az idegrostok átlagos szélességét (mm/mm²). A diabéteszes csoportban vizsgáltuk a fraktál dimenziót, azaz corneális idegek strukturális komplexitását is.

A corneális sejtrétegek elemzéséhez minden szemről 3 jó minőségű képet választottunk ki. A corneális bazális epitel sejtek, az endotel sejtek, az elülső és hátsó stroma keratocyták, valamint a dendritikus sejtek sűrűségét a készülék beépített szoftvere segítségével határoztuk meg egy maszkolt vizsgáló segítségével. Három mérés átlagát használtuk fel az összehasonlító analízishez. A bazális epitelium kijelölése a Bowman membrán előtti első 3 szkenben, az elülső stromáé a Bowman membrán mögötti első 3 felvételben, míg a poszterior stromáé közvetlenül a Descemet membrán előtti első 3 képben történt.^{136,137} Az értékelt terület az epitel sejteket, a keratocytákat és az endotel sejteket ábrázoló felvételek vonatkozásában legalább 50 sejtet tartalmazott. A sejtek megjelölése manuálisan történt, majd a szoftver automatikusan megadta a sejtsűrűség értéket (sejt/mm²). A dendritikus sejtek számolását a centrális corneális epiteliumban végeztük.

A dendritikus sejtek területének méréséhez az IVCN felvételeken az ImageJ szoftver (<http://imagej.nih.gov/ij/>; National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) Set scale, Threshold és ROI Manager funkcióját használtuk.¹³⁸ Első lépésben a mértéket 50 µm-re állítottuk az eredeti IVCN kép alapján. Ezt követően a küszöb („Threshold”) funkciót alkalmaztuk a dendritikus sejtek kiemelésére. A ROI Manager „nyomkövető” funkcióját használtuk a dendritikus sejtek megjelölésére. Minden vizsgálati alany esetében 3-3 felvételen 10 dendritikus sejt méretének meghatározása történt.¹³⁸ Csak a dendrittel rendelkező, érett dendritikus sejtek kerültek bevonásra a sejtsűrűség és a sejt terület

meghatározásánál. Az sejt denzitás és terület méréseket két független vizsgáló végezte, majd egy maszkolt vizsgáló készítette el az összehasonlító analízist.

Feljegyeztük a corneális idegrostok egyéb elváltozásait is, rögzítettük a mikroneuromák, az idegrost tortuozitás, a szubbazális idegrostok folytonosság megszakítottságának és a gyöngyfűzészerű stromális idegek jelenlétét is.

5.3. Statisztikai elemzések

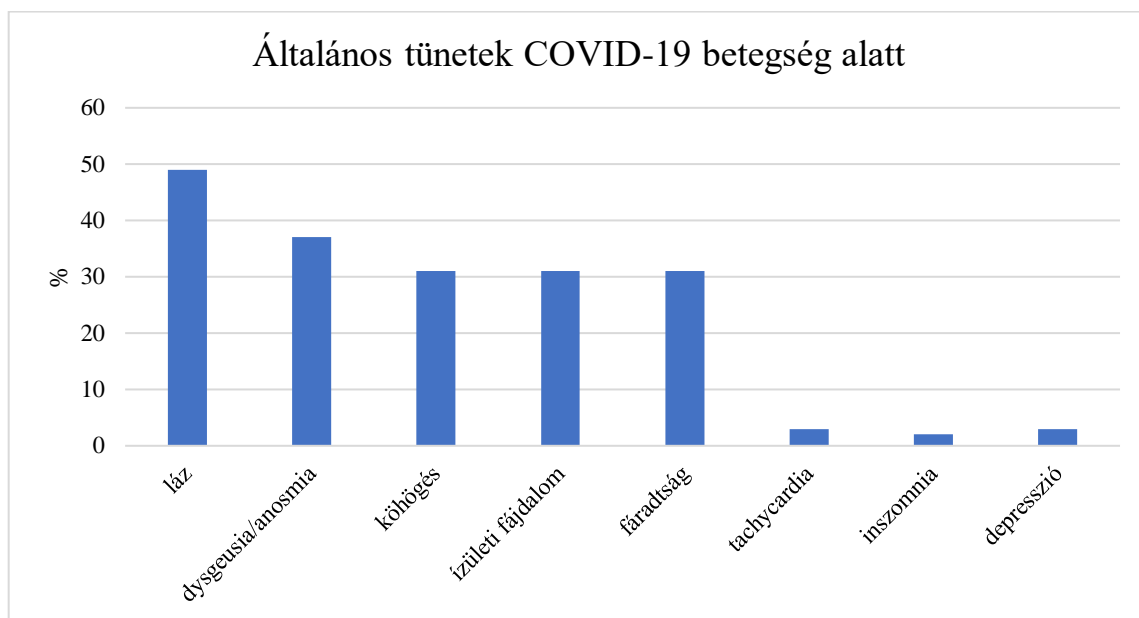
A statisztikai elemzést a MedCalc 14.8.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium), az IBM SPSS 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA), valamint a GraphPad Prism 9.1.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) szoftverek segítségével végeztük. Az eredményeket átlag±standard deviáció formában és az átlag 95%-os konfidencia intervallumával írtuk le. Az adatok normál eloszlásának vizsgálatához Kolmogorov-Smirnov tesztet végeztünk. Normál eloszlás esetén a páronkénti összehasonlításhoz páros vagy független t-próbát alkalmaztunk. Amennyiben az adatok eloszlása nem követte a Gauss-eloszlást, Mann-Whitney U-tesztet vagy Wilcoxon próbát használtunk. A korrelációk elemzéséhez Pearson vagy Sperman-féle korrelációs tesztet alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük az eredményt, amennyiben a p érték 0,05-nél kisebb volt.

6. Eredmények

6.1. Az enyhe COVID-19 betegség mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményeinek vizsgálata

Harmincöt, PCR teszttel igazolt, enyhe SARS-CoV-2 fertőzésen átesett egyén (18 férfi és 17 nő, átlagéletkor: $43,3 \pm 13,8$ év, 21 és 67 év között) 35 szemének és 28 egészséges, korcsoport-azonos kontroll (11 férfi és 17 nő, átlagéletkor: $46,7 \pm 17,6$ év, 20 és 67 év között) 28 szemének vizsgálata történt. A két csoport között korösszetétel ($p=0,388$) és a nemek közti megoszlás ($p=0,345$) tekintetében szignifikáns különbség nem volt. Az első pozitív PCR teszt és a szemészeti vizsgálat között átlagosan $13,5 \pm 6,1$ hét telt el (2 és 26 hét között).

A fertőzés alatt láz 17 betegnél (49%), ízérzés és szaglás zavar 13 betegnél (37%), fáradtság, köhögés, ízületi fájdalom 11-11 betegnél (31%), álmatlanság 2 betegnél (6%), tachycardia és depresszió 1-1 betegnél (3%) jelentkezett (11. ábra). Hat beteg (17%) számolt be szemészeti tünetekről a megbetegedés alatt, mint például égő érzés, idegentest érzés, orbitális és oculáris fájdalom. Három (9%) beteg teljesen tünetmentes volt a fertőzés alatt.



11. ábra. Általános tünetek megoszlása a SARS-CoV-2 fertőzés alatt.

A poszt-COVID csoportban 6 betegnek volt jól kontrollált kettes típusú diabétesze, 6 betegnek hipertóniája (5 betegnél a diabétesz és a hipertónia együtt állt fenn), valamint 1

beteg esetében a nem vizsgált szemén korábban szemfenéki vénás érelzáródás zajlott. Diabéteszes retinopátiát egy beteg esetén sem észleltünk.

A szemészeti biometriai mérésekben nem volt szignifikáns különbség az egészséges és a poszt-COVID csoport között (2. táblázat). A réslámpás vizsgálat során szemfelszíni vagy elülső szegmentumot érintő eltérést nem találtunk.

2. táblázat. Biometriai adatok összehasonlítása egészséges egyéneknél és SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél

	Egészséges egyének [§]	SARS-CoV-2 fertőzésen átesettek [§]	p*
<i>Elülső felszíni K1 (D)</i>	43,480±1,763 (42,768 – 44,192)	42,828±1,335 (42,354 – 43,301)	0,125
<i>Elülső felszíni K2 (D)</i>	44,203±1,950 (43,415 – 44,991)	44,040±2,117 (43,290 – 44,791)	0,737
<i>Astigmia (D)</i>	0,74±0,433 (0,565 – 0,915)	0,855±0,419 (0,706 – 1,003)	0,454
<i>CCT (µm)</i>	539,87±29,579 (527,079 – 552,661)	545,848±40,987 (531,315 – 560,382)	0,510
<i>ACD (mm)</i>	2,785±0,564 (2,557 – 3,013)	2,973±0,440 (2,817 – 3,129)	0,148
<i>WTW (mm)</i>	11,826±0,405 (11,658 – 11,993)	12,029±0,383 (11,891 – 12,167)	0,062
<i>LT (mm)</i>	4,122±0,318 (3,993 – 4,250)	4,208±0,438 (4,048 – 4,369)	0,421
<i>AL (mm)</i>	23,345±1,045 (22,923 – 23,767)	23,822±1,043 (23,452 – 24,192)	0,087

K=keratometria; CCT=centrális cornea vastagság; ACD=elülső csarnok mélység; WTW= „white-to-white” távolság; LT=lencse vastagság; AL=tengelyhossz

§Átlag ± standard deviáció (95% konfidencia intervallum)

* Független t-próba

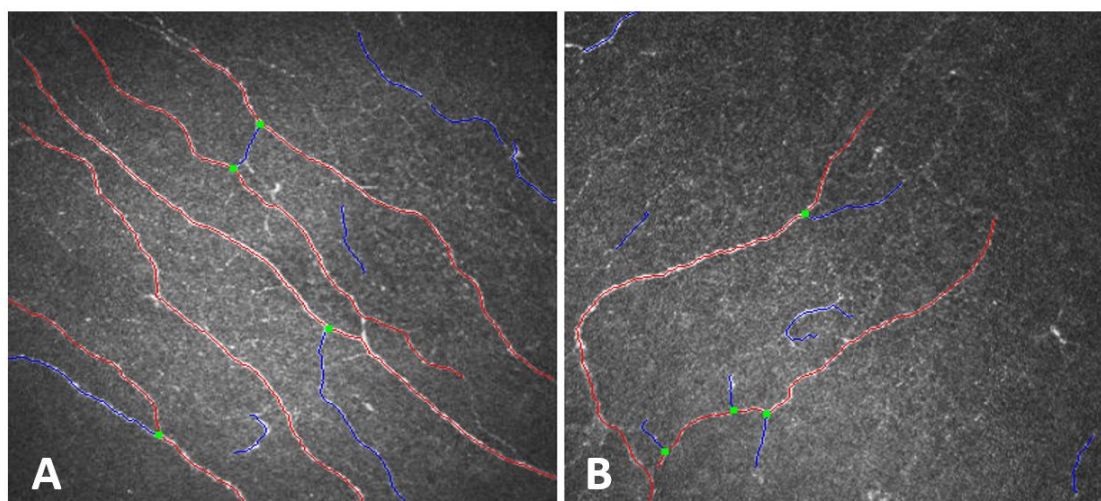
Szignifikánsan alacsonyabb corneális szubbazális idegrost denzitás (p=0,0009), idegrost elágazódás denzitás (p=0,0004), idegrost hossz (p<0,0001), teljes idegrost elágazódás denzitás (p=0,002) és idegrost terület (p=0,0001) értéket találtunk a SARS-CoV-2 fertőzésen átesett csoportban az egészséges kontrollokkal összehasonlítva (3. táblázat, 12. ábra). Az idegrost szélességben nem volt szignifikáns különbség a két csoport között (p=0,421).

3. táblázat. A szaruhártya szubbazális idegrost morfológiájának összehasonlítása egészséges egyéneknél és SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél

	Egészséges egyének [§]	SARS-CoV-2 infekción átesettek [§]	p*
<i>Idegrost elágazódás denzitás (No/mm²)</i>	23,63±15,940 (17,449 – 29,810)	10,542±11,350 (6,518 – 14,567)	0,0004
<i>Idegrost terület (mm²/mm²)</i>	0,006±0,002 (0,005 – 0,007)	0,004±0,002 (0,003 – 0,004)	0,0001
<i>Idegrost denzitás (No/mm²)</i>	18,57±6,114 (16,200 – 20,941)	11,742±8,649 (8,675 – 14,809)	0,0009
<i>Idegrost hossz (mm/mm²)</i>	12,98±3,141 (11,763 – 14,198)	8,605±3,649 (7,311 – 9,899)	<0,0001
<i>Idegrost szélesség (mm/mm²)</i>	0,022±0,002 (0,021 – 0,022)	0,022±0,002 (0,021 – 0,023)	0,421
<i>Teljes idegrost elágazódás sűrűség (No/mm²)</i>	37,20±20,415 (29,284 – 45,116)	21,937±16,424 (16,113 – 27,760)	0,002

§Átlag ± standard deviáció (95% konfidencia intervallum)

* Független t-próba



12. ábra. A szubbazális idegi plexus ACCMetrics szoftverrel történő elemzése (piros: idegrost, kék: idegrost ág, zöld: elágazódási pont). A: Kornak megfelelő idegrost morfológia egy 69 éves egészséges egyénnél. B: Csökkent idegrost sűrűség SARS-CoV-2 infekciót követően egy 69 éves betegnél. (Saját ábra)

A centrális chorioidea vastagság nagyobb volt a normál csoportban, azonban statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtunk a 2 csoport között (p=0,101) (4. táblázat). A retinális vaszkuláris denzitás a szuperficiális kapilláris hálózat temporális részén szignifikánsan alacsonyabb volt a poszt-COVID csoportban (p=0,019), a többi retinális felszínes és mély kapilláris hálózat denzitás értékben statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtunk (4. táblázat). A FAZ területe nem mutatott számottevő

különbséget a két csoport között (p=0,582) (4. táblázat). A retinális idegrostréteg vastagsága magasabb volt a normál csoportban, de egyik idegrostréteg vagy ganglionsejt-komplex paraméter sem mutatott szignifikáns különbséget az egészséges és a poszt-COVID alanyok között (4. táblázat).

4. táblázat. OCT és OCTA paraméterek összehasonlítása egészséges egyéneknél és SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél

	Egészséges egyének [§]	SARS-CoV-2 fertőzésen átesettek [§]	p*
<i>Centrális chorioidea vastagság (μm)</i>	304,769±81,420 (271,883 – 337,656)	269,941±79,458 (242,217 – 297,665)	0,101
<i>VD az SCP centrumában (%)</i>	21,363±5,248 (19,328 – 23,398)	22,931±5,137 (21,139 – 24,723)	0,241
<i>VD az SCP felső kvadránsában (%)</i>	51,32±2,357 (50,406 – 52,234)	50,546±3,010 (49,496 – 51,596)	0,272
<i>VD az SCP temporális kvadránsában (%)</i>	48,526±2,666 (47,492 – 49,560)	47,166±1,761 (46,551 – 47,780)	0,019
<i>VD az SCP alsó kvadránsában (%)</i>	50,916±3,312 (49,632 – 52,201)	50,714±2,649 (49,775 – 51,654)	0,792
<i>VD az SCP nazális kvadránsában (%)</i>	47,154±2,899 (46,030 – 48,278)	46,254±1,974 (45,565 – 46,943)	0,153
<i>FAZ területe az SCP-ben (μm²)</i>	267,907±83,553 (234,854 – 300,959)	252,822±199,750 (210,361–295,284)	0,582
<i>VD a DCP centrumában (%)</i>	19,065±3,688 (17,575 – 20,555)	18,764±5,437 (16,836 – 20,691)	0,810
<i>VD a DCP felső kvadránsában (%)</i>	52,071±3,682 (50,644 – 53,499)	53,006±3,688 (51,719 – 54,293)	0,324
<i>VD a DCP temporális kvadránsában (%)</i>	47,941±3,768 (46,480 – 49,403)	47,115±2,420 (46,271 – 47,959)	0,300
<i>VD a DCP alsó kvadránsában (%)</i>	68,755±88,656 (34,377 – 103,132)	52,943±3,253 (51,808 – 54,078)	0,444
<i>VD a DCP nazális kvadránsában (%)</i>	48,594±3,096 (47,393 – 49,794)	47,776±3,815 (46,445 – 49,107)	0,365
<i>GCL ++ a centrumban (μm)</i>	52,481±8,116 (49,271–55,692)	61,353±25,830 (52,340–70,366)	0,091
<i>GCL ++ belső gyűrű (μm)</i>	116,454±7,325 (113,556 – 119,351)	114,992±12,067 (110,782 – 119,203)	0,582
<i>GCL ++ külső gyűrű (μm)</i>	108,731±6,822 (106,033 – 111,430)	117,809±65,197 (95,061 – 140,557)	0,475
<i>GCL+ a centrumban (μm)</i>	52,481±8,116 (49,271 – 55,692)	61,353±25,830 (52,340 – 70,366)	0,091
<i>GCL + belső gyűrű (μm)</i>	90,417±6,189 (87,968 – 92,865)	100,338±40,810 (86,099 – 114,578)	0,216
<i>GCL + külső gyűrű (μm)</i>	67,778±6,402 (65,245 – 70,310)	74,279±34,012 (62,412 – 86,147)	0,332
<i>RNFL vastagság (μm)</i>	108,269±10,850 (103,887 – 112,652)	103,235±12,524 (98,865 – 107,605)	0,108

VD= vaszkuláris denzitás; SCP= szuperficiális kapilláris hálózat; DCP=mély kapilláris hálózat; FAZ=foveoláris avaszkuláris zóna; GCL=ganglionsejt-réteg; RNFL=retinális idegrost réteg
centrum: a centrális 1 mm-ben mért vastagság; belső gyűrű: a centrális 3 mm-ben mért vastagság; külső gyűrű: a centrális 6 mm-ben mért vastagság
§Átlag± standard deviáció (95% konfidencia intervallum)

* Független t-próba

A metabolikus betegségben szenvedő egyének poszt-COVID csoportból történő kivonása után is szignifikáns csökkenést találtunk az idegrost denzitás ($p=0,0001$), az idegrost elágazódás denzitás ($p=0,0002$), az idegrost hossz ($p<0,0001$), a teljes idegrost elágazódás denzitás ($p=0,0023$) és az idegrost terület ($p=0,0001$) értékekben a SARS-CoV-2 fertőzésen átesett csoportban. Az idegrost szélesség nem különbözött szignifikánsan a 2 csoport között ($p=0,206$). Statisztikailag szignifikáns különbséget sem a felszínes, sem pedig a mély kapilláris hálózat vaszkuláris denzitásában nem találtunk, egyedül a szuperficiális kapilláris hálózat temporális régiójában detektáltunk szignifikancia tekintetében határértéken lévő csökkenést a COVID-19 fertőzésen átesetteknél ($p=0,051$).

Statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk az idegrost szélesség és a felszínes ($r = 0,618$; $p=0,0001$), valamint a mély ($r=0,679$; $p=0,0001$) kapilláris hálózat nazális régiójának vaszkuláris sűrűsége között a normál csoportban. Szignifikáns inverz korreláció volt az idegrost szélesség és a mély kapilláris hálózat nazális régiójának vaszkuláris denzitása között ($r = -0,391$; $p= 0,027$) a poszt-COVID csoportban. Más statisztikailag szignifikáns korrelációt nem találtunk a szaruhártya idegrost morfológiája és az OCT angiográfia paraméterei között. Az első pozitív PCR teszt és a szemészeti vizsgálat között eltelt idő nem mutatott szignifikáns korrelációt a mért paraméterek egyikével sem ($p>0,05$).

6.2. A szaruhártya neuroinflammatorikus eltéréseinek vizsgálata SARS-CoV-2 fertőzést követően

Harminc, PCR tesztel igazoltan SARS-CoV-2 fertőzésen átesett egyén (16 férfi és 14 nő, átlagéletkor: $41,8 \pm 13,6$ év, 21 és 66 év között) 30 szemének és 41 egészséges, korcsoport-azonos kontroll (22 férfi és 19 nő, átlagéletkor: $47,98 \pm 19,3$ év, 19-74 év között) 41 szemének vizsgálata történt. A két csoport között korösszetétel ($p=0,140$) és a nemek közti arány ($p=0,979$) tekintetében szignifikáns különbség nem volt. Az első pozitív PCR teszt és a szemészeti vizsgálat között átlagosan $13,93 \pm 6,13$ hét telt el (2 és 26 hét között). A COVID-19 fertőzés miatt egyik beteg sem volt hospitalizálva, a betegek enyhe tünetekről számoltak be. Szemészeti manifesztációt egyik beteg sem tapasztalt.

A réslámpás vizsgálat során szemfelszíni vagy elülső szegmentumot érintő, az oftalmoszkópos vizsgálatnál szemfenéki eltérést nem találtunk egyik csoportban sem. Az epitel sejtek ($p=0,091$), az endotel sejtek ($p=0,519$) és az elülső stroma keratocyták ($p=0,693$) denzitásában nem volt szignifikáns különbség a két csoport között (5. táblázat). A hátsó stromában a keratocytá denzitás szignifikánsan alacsonyabb volt a SARS-CoV-2 infekción átesett betegeknél ($p=0,0006$) (5. táblázat). A cornea centrális részén a dendritikus sejtek denzitása ($p=0,0004$) és területe ($p<0,0001$) is szignifikánsan nagyobb volt a COVID-19 betegségen átesetteknél (5. táblázat, 13. ábra, 15. B ábra).

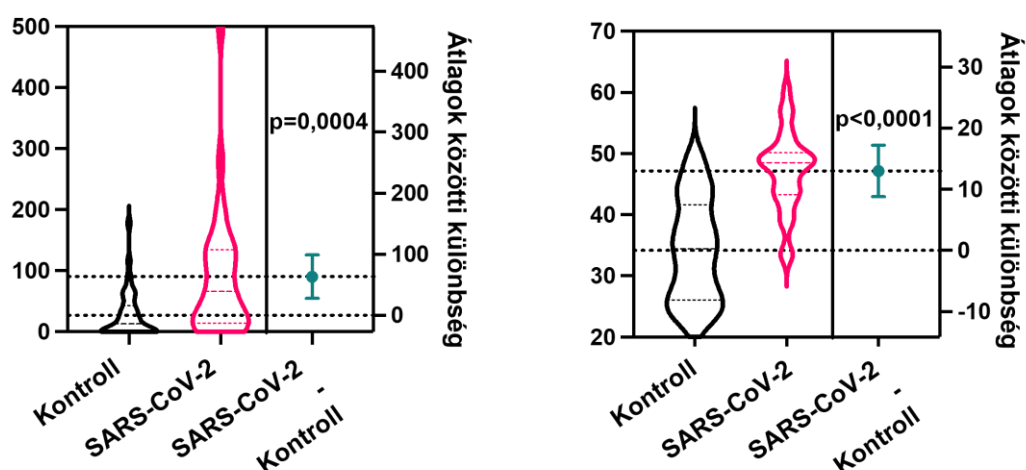
5. táblázat. Szaruhártya mikrostrukturális eltéréseinek összehasonlítása egészséges egyéneknél és SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél

	Egészséges egyének §	SARS-CoV-2 fertőzésen átesettek §	p*
<i>Dendritikus sejtek sűrűsége (sejt/mm²)</i>	27,049± 38,316 (14,955 – 39,143)	90,367± 105,325 (51,038 – 129,696)	0,0004
<i>Dendritikus sejtek területe (µm²)</i>	34,161±8,367 (30,707-37,615)	47,139±6,539 (44,498-49,780)	<0,0001
<i>Epitel sejtek sűrűsége (sejt/mm²)</i>	8147,677± 1069,327 (7796,198 – 8499,156)	7631,158± 1065,082 (7117,805 – 8144,511)	0,091
<i>Elülső stroma keratocytá denzitás (sejt/mm²)</i>	281,932± 82,186 (254,918 – 308,946)	273,48± 83,566 (238,986 – 307,974)	0,693
<i>Hátsó stroma keratocytá denzitás (sejt/mm²)</i>	251,195± 36,514 (238,840 – 263,550)	190,667± 77,541 (141,399 – 239,934)	0,0006
<i>Endotel sejtek sűrűsége (sejt/mm²)</i>	3116,551± 537,523 (2931,905 – 3301,196)	2937,0± 313,080 (2438,819 – 3435,181)	0,519

§ Átlag ± standard deviáció (95% konfidencia intervallum)

* Független t-próba

Dendritikus sejt sűrűség (sejt/mm²) Dendritikus sejt terület (µm²)



13. ábra. A diagram a dendritikus sejtek denzitása és mérete közötti különbséget mutatja egészséges egyénekénél és SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél.

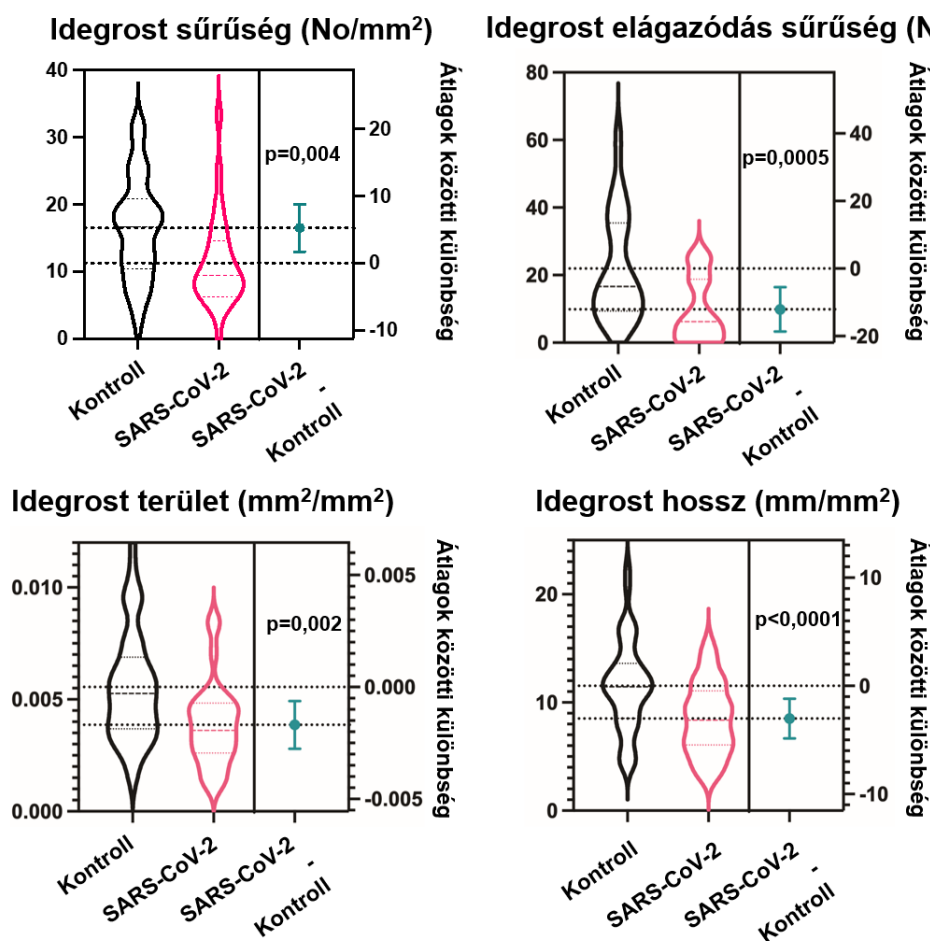
A poszt-COVID csoportban szignifikánsan megváltozott szubbazális idegrost morfológiát találtunk az egészségesekkel összehasonlítva minden paraméter tekintetében, kivéve az idegrost szélességet ($p=0,116$). A SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél szignifikánsan alacsonyabb volt az idegrost denzitás ($p=0,004$) (16. A ábra), az idegrost elágazódás denzitás ($p=0,0005$), az idegrost hossz ($p<0,0001$), a teljes idegrost elágazódás denzitás ($p=0,008$) és az idegrost terület ($p=0,002$) (6. táblázat, 14. ábra).

6. táblázat. Szubbazális idegrost morfológia összehasonlítása egészséges egyénekénél és SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél

	Egészséges egyének [§]	SARS-CoV-2 fertőzésen átesettek [§]	p*
Idegrost denzitás (No/mm ²)	16,493 ±7,589 (13,999 – 18,987)	11,249 ±6,758 (8,726 – 13,773)	0,0042
Idegrost elágazódás denzitás (No/mm ²)	21,936 ±15,827 (16,659 – 27,213)	9,86 ±9,522 (6,305 – 13,416)	0,0005
Idegrost hossz (mm/mm ²)	11,532 ±4,152 (10,221 – 12,842)	8,509 ±3,358 (7,255 – 9,763)	<0,0001
Teljes idegrost elágazódás sűrűség (No/mm ²)	34,868 ±21,884 (27,961 – 41,776)	22,186 ±18,25 (15,372 – 29,001)	0,008
Idegrost terület (mm ² /mm ²)	0,006±0,002 (0,005 - 0,006)	0,004 ±0,002 (0,003 – 0,005)	0,002
Idegrost szélesség (mm/mm ²)	0,022±0,002 (0,021 - 0,023)	0,023±0,003 (0,022 - 0,024)	0,116

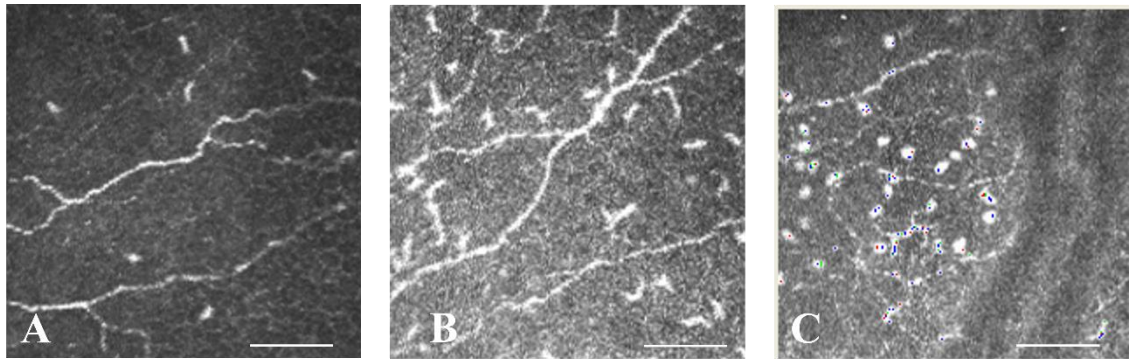
§ Átlag ± standard deviáció (95% konfidencia intervallum)

* Független t-próba, Mann-Whitney U teszt

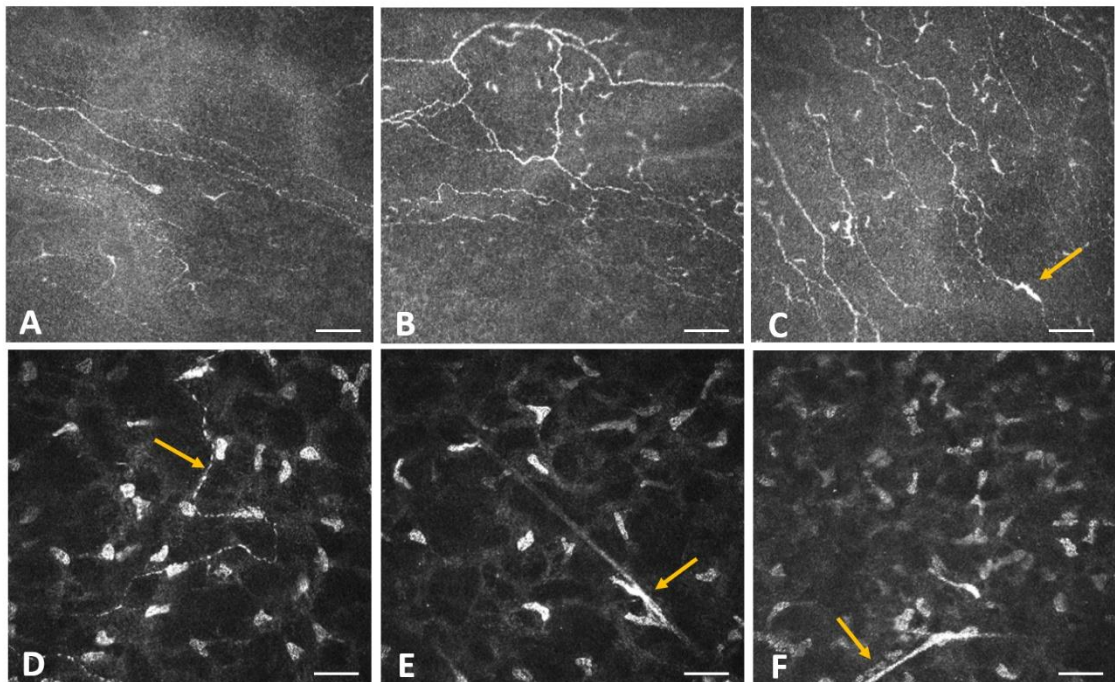


14. ábra. A diagram a különböző szubbazális idegi plexus paraméterek eloszlását ábrázolja SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél és egészséges kontrolloknál.

Hiperreflektív, kerek, dendrittel nem rendelkező gyulladásosejtet is azonosítottunk a SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél (15. C ábra). Hat SARS-CoV-2 infekción átesett betegnél szubbazális és stromális mikroneuromákat detektáltunk (16. C, E, F ábra). Az in vivo konfokális mikroszkóppal készült felvételeken a poszt-COVID csoportban fokozott szubbazális idegrost tortuozitást (16. B és C ábra), az idegrostokban folytonosság megszakítottságot, valamint a stromális idegrostok gyöngyfűzészerű megjelenését (16. D ábra) azonosítottuk (16. ábra).



15. ábra. Elszórtan megjelenő dendritikus sejtek egy egészséges egyénnél (A). Nagy sűrűségben megjelenő dendritikus sejtek SARS-CoV-2 infekciót követően (B). Hiperreflektív, dendrit nélküli gyulladásosejtek COVID-19 betegségét követően (C). A képeken látható skála 50 μm -t reprezentál. (Saját ábra)



16. ábra. Corneális szubbazális (A-C) és stromális (D-F) idegrost eltérések SARS-CoV-2 fertőzést követően: csökkent idegrost denzitás (A), tortuozitás (B és C), fuziform mikroneuroma (C), gyöngyfűzészerű idegrost (D), laterális mikroneuroma (E és F). A képeken látható skála 50 μm -t reprezentál. (Saját ábra)

Statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk a dendritikus sejtek száma és a teljes idegrost elágazódás denzitás között ($r=0,479$; $p=0,008$) a COVID-19 fertőzésen átesett betegeknel. Inverz korrelációt találtunk a dendritikus sejtek denzitása és területe között ($r=-0,427$; $p=0,030$) a poszt-COVID csoportban. Minden idegrost paraméter között szignifikáns korreláció volt a SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél ($p\leq 0,05$). Az elülső stroma keratocyták sűrűsége inverz korrelációt mutatott az idegrostok területével ($r=-0,498$; $p=0,011$). Egyéb statisztikailag szignifikáns korrelációt nem találtunk a szaruhártya idegrost morfológia és a sejt denzitások között egyik sejtrétegben sem.

6.3. A diabétesz mellitusz mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményeinek vizsgálata

Ötvenkettő diabéteszes egyén 52 szemének és 35 kontroll 35 random módon kiválasztott szemének vizsgálata történt. Az egészséges csoportban az átlagéletkor $49,88 \pm 17,01$ év (20 és 73 év között), a diabéteszes csoportban $56,04 \pm 13,66$ év volt (22 és 78 év között). A diabéteszeseknél az átlagos betegség fennállás $11,17 \pm 11,73$ év volt (1 év 52 év között). Tíz T1DM-es és 42 T2DM-es beteg beválasztására került sor. Az átlagos HbA1c érték $7,28 \pm 1,33\%$ volt (5,5% és 13% között). A diabéteszes betegek testtömegindexe $31,01 \pm 6,28$ volt (21,26 és 47,45 között). A szemfenék vizsgálat során az egészséges csoportban kóros elváltozás nem volt látható. A diabéteszes csoportban 44 beteg esetében nem volt jele diabéteszes retinopátiának, 8 betegnél néhány mikroaneurizma volt azonosítható (enyhe NPDR). Az elülső szegmens vizsgálatánál egyik csoportban sem találtunk kóros eltérést.

A biometriai adatokban a centrális szaruhártya ($p=0,016$) és a szemlencse vastagságán ($p=0,018$) kívül statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtunk a vizsgálati csoportok között (7. táblázat).

7. táblázat. Biometriai adatok összehasonlítása egészséges egyéneknél és diabétesz mellituszban szenvedő betegeknél

	Egészséges egyének [§]	Diabéteszes betegek [§]	p*
<i>Elülső K1(D)</i>	$43,436 \pm 1,593$ (42,872 - 44,001)	$43,258 \pm 1,391$ (42,773 - 43,743)	0,341
<i>Elülső K2 (D)</i>	$44,157 \pm 1,720$ (43,547 - 44,767)	$44,011 \pm 1,469$ (43,499 - 44,524)	0,319
<i>Astigmia (D)</i>	$0,912 \pm 0,628$ (0,693 - 1,131)	$0,735 \pm 0,372$ (0,603 - 0,867)	0,454
<i>CCT (μm)</i>	$545,625 \pm 50,365$ (527,466 - 563,784)	$563,618 \pm 42,546$ (548,773 - 578,462)	0,016
<i>ACD (mm)</i>	$2,757 \pm 0,555$ (2,560 - 2,953)	$2,83 \pm 0,564$ (2,627 - 3,034)	0,267
<i>WTW (mm)</i>	$11,858 \pm 0,406$ (11,712 - 12,004)	$11,763 \pm 0,395$ (11,625 - 11,901)	0,379
<i>LT (mm)</i>	$4,262 \pm 0,363$ (4,134 - 4,391)	$4,506 \pm 0,388$ (4,355 - 4,656)	0,018
<i>AL (mm)</i>	$23,373 \pm 1,113$ (22,978 - 23,767)	$23,197 \pm 0,918$ (22,871 - 23,522)	0,677

K=keratometria; CCT=centrális cornea vastagság; ACD=elülső csarnok mélység; WTW=„white-to-white” távolság; LT=lencse vastagság; AL=tengelyhossz

[§]Átlag±standard deviáció (95% konfidencia intervallum)

* Mann-Whitney U-teszt

Az egészséges kontrollokkal összehasonlítva a diabéteszes csoportban az idegrost szélességen kívül ($p=0,586$) az összes szubbazális idegrost paraméter szignifikánsan csökkent. A diabéteszes betegeknél szignifikánsan alacsonyabb volt az idegrost denzitás ($p<0,0001$), az idegrost elágazódás denzitás ($p=0,0001$), az idegrost hossz ($p<0,0001$), a teljes idegrost elágazódás denzitás ($p=0,007$), az idegrost terület ($p=0,006$) és a fraktál dimenzió ($p<0,0001$) (8. táblázat, 17. ábra).

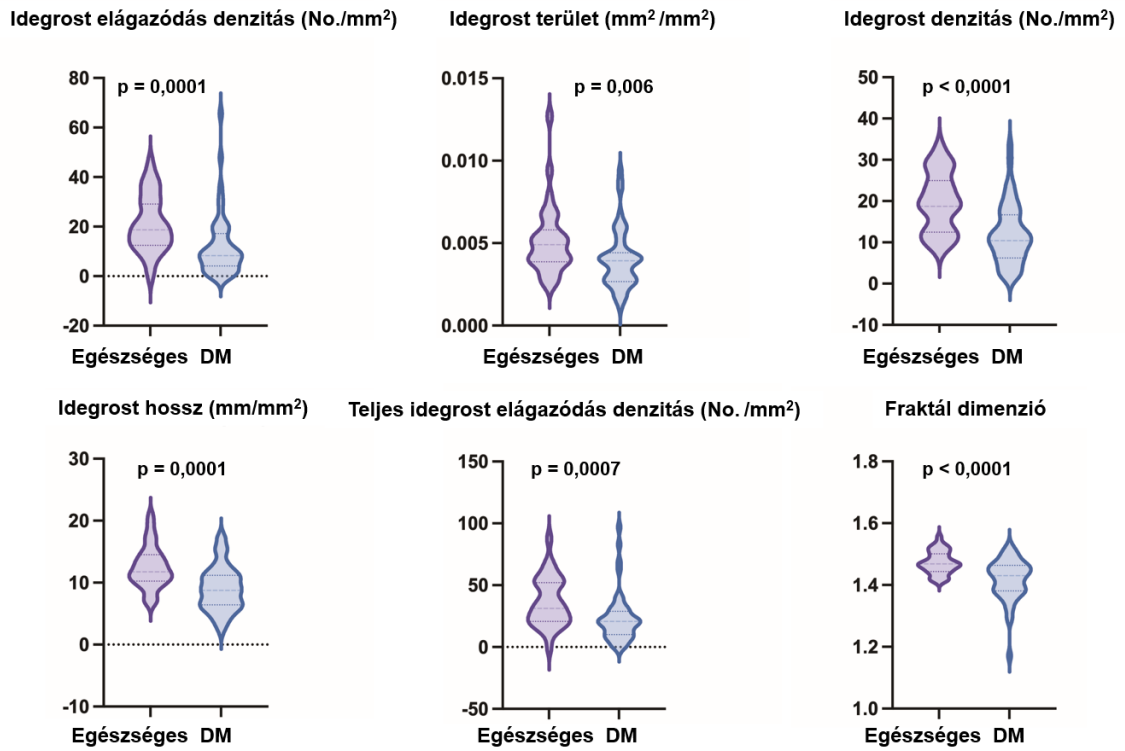
Nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést az idegrost morfológiai paraméterek, a betegség fennállás és a HbA1c értékek között.

8. táblázat. Corneális szubbazális idegrost morfológia összehasonlítása egészséges egyéneknél és diabétesz mellitusban szenvedő betegeknél

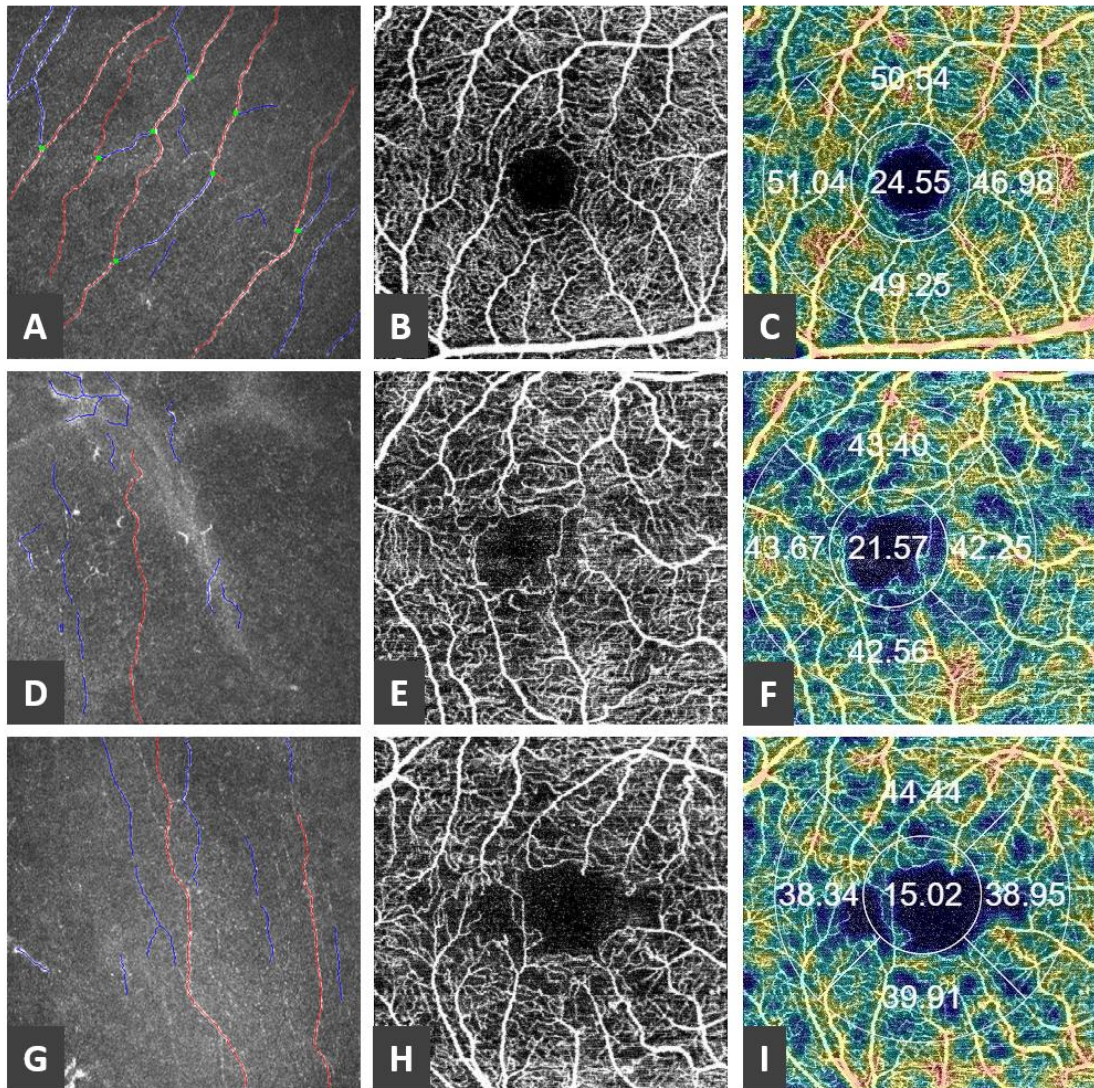
	Egészséges egyének [§]	Diabéteszes betegek [§]	p*
<i>Idegrost elágazódás denzitás (No/mm²)</i>	21,252±11,414 (17,065 - 25,439)	12,095±12,663 (8,496 - 15,694)	0,0001
<i>Idegrost terület (mm²/mm²)</i>	0,005±0,002 (0,004 - 0,006)	0,004±0,002 (0,004 - 0,005)	0,006
<i>Idegrost denzitás (No/mm²)</i>	19,723±7,216 (17,076 - 22,370)	12,016±7,192 (9,972 - 14,060)	<0,0001
<i>Idegrost hossz (mm/mm²)</i>	12,489±3,389 (11,245 - 13,732)	9,041±3,584 (8,022 - 10,059)	0,0001
<i>Idegrost szélesség (mm/mm²)</i>	0,022±0,002 (0,021 - 0,022)	0,021±0,002 (0,021 - 0,022)	0,586
<i>Teljes idegrost elágazódás sűrűség (No/mm²)</i>	36,49±19,740 (29,249 - 43,730)	22,965±19,625 (17,388 - 28,542)	0,0007
<i>Idegrost fraktál dimenzió</i>	1,473±0,036 (1,460 - 1,486)	1,418±0,066 (1,399 - 1,437)	<0,0001

[§]Átlag±standard deviáció (95%)

* Mann-Whitney U-teszt

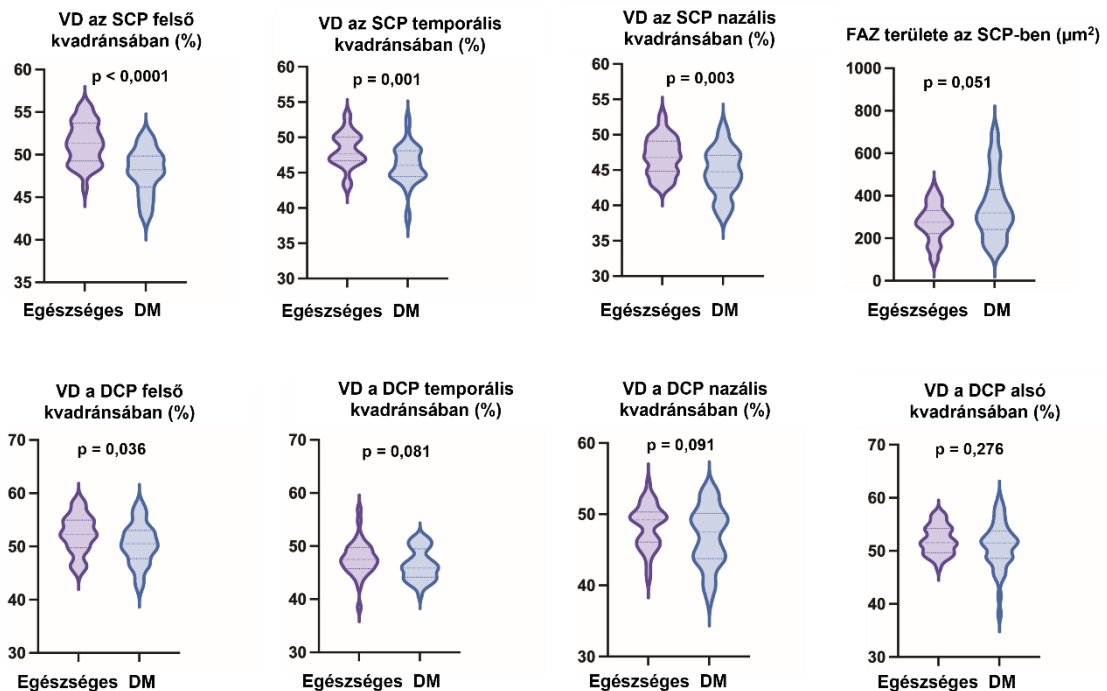


17. ábra. A diagramok a szubbazális idegrost morfológiai adatok gyakoriság eloszlását mutatják az egészséges és a diabéteszes vizsgálati alanyoknál.



18. ábra. In vivo konfokális mikroszkópos képek a szaruhártya szubbazális idegi plexusáról: piros = idegrost, kék= idegrost ág, zöld = elágazódási pont (A, D, G). OCT angiográfias felvételek a retina szuperficiális kapilláris plexusáról (B, E, H). Vaszkuláris denzitás térkép a felszínes kapilláris hálózatról (C, F, I). Normál szubbazális idegrost morfológia (A), OCTA felvétel (B) és VD térkép (C) egy egészséges egyénről. Megváltozott idegrost morfológia (D), csökkent FAZ cirkularitás (E) és vaszkuláris denzitás (F) egy 44 éves beteg esetén, akinél 40 éve diagnosztizáltak T1DM-et (HbA1c: 7,67%). A szemfenéken diabéteszes retinopátia nem volt látható. Szubbazális idegrost károsodás (G), megnagyobbodott FAZ (H) és csökkent érsűrűség (I) egy 49 éves T2DM-es betegnél 10 éves betegség fennállást követően (HbA1c: 9,11%). (saját ábra)

Nem volt szignifikáns különbség a centrális retina vastagságában a két csoport között ($p=0,089$) (9. táblázat). Szignifikánsan alacsonyabb centrális chorioidea vastagságot detektáltunk a diabéteszes csoportban ($p=0,016$). A diabéteszeseknél a felszínes kapilláris hálózatban az érsűrűség szignifikánsan alacsonyabb volt a felső ($p<0,0001$), a temporális ($p=0,001$) és a nazális ($p=0,003$) kvadránsban (9. táblázat, 19. ábra). A mély kapilláris hálózatban egyedül a felső kvadránsban észleltünk szignifikánsan csökkent kapilláris denzitást a diabéteszes csoportban ($p=0,036$) (9. táblázat, 19. ábra). A foveoláris avaszkuláris zóna a diabéteszes csoportban megnagyobbodott a kontroll csoportéhoz képest, azonban szignifikancia tekintetében az eredmény határértéken volt ($p=0,051$). A GCL+ a belső ($p<0,0001$), a GCL++ értékek a belső ($p<0,0001$) és a külső ($p=0,037$) gyűrűben is szignifikánsan alacsonyabbak voltak a diabéteszes csoportban (9. táblázat).



VD= vaszkuláris denzitás; SCP= felszínes kapilláris plexus; DCP= mély kapilláris plexus; FAZ= foveoláris avaszkuláris zóna; DM= diabétesz mellitusz

19. ábra. A diagramok a felszínes és a mély kapilláris hálózat vaszkuláris denzitás és a FAZ terület adatainak gyakoriság eloszlását mutatják egészséges és diabéteszes vizsgálati alanyoknál.

Szignifikáns inverz korrelációt volt kimutatható a betegség fennállás és a vaszkuláris denztiás között az SCP felső ($r=-0,539$, $p<0,0001$), temporális ($r=-0,557$, $p<0,0001$), alsó ($r=-0,433$, $p=0,005$) és nazális ($r=-0,372$, $p=0,015$) kvadránsában, valamint a betegség fennállás és a DCP alsó ($r=-0,369$, $p=0,019$) és nazális ($r=-0,458$, $p=0,003$) kvadránsának kapilláris sűrűsége között. A HbA1c érték egyik OCTA paraméterrel sem mutatott szignifikáns korrelációt. Nem tudtunk szignifikáns összefüggést kimutatni a cornea szubbazális idegrost morfológiai és a retina mikrovaszkuláris paramétereit között a két csoport összehasonlításakor.

9. táblázat. OCT és OCTA paraméterek összehasonlítása egészséges egyéneknél és diabétesz mellituszban szenvedő betegeknél

	Egészséges egyének [§]	Diabéteszes betegek [§]	p*
<i>Centrális retina vastagság (μm)</i>	259,029±18,978 (252,408 – 265,651)	251,0±24,491 (244,182 – 257,818)	0,089
<i>Centrális chorioidea vastagság (μm)</i>	273,455±72,974 (247,579 - 299,330)	237,708±81,935 (213,917 - 261,500)	0,016
<i>VD az SCP centrumában (%)</i>	21,649±5,442 (19,780 - 23,519)	19,88±5,219 (18,274 - 21,486)	0,116
<i>VD az SCP felső kvadránsában (%)</i>	51,377±2,449 (50,535 - 52,218)	48,063±2,645 (47,239 - 48,887)	<0,0001
<i>VD az SCP temporális kvadránsában (%)</i>	48,207±2,456 (47,364 - 49,051)	46,069±2,786 (45,212 - 46,927)	0,001
<i>VD az SCP alsó kvadránsában (%)</i>	50,990±3,067 (49,920 – 52,061)	49,147±3,910 (47,929 - 50,366)	0,138
<i>VD az SCP nazális kvadránsában (%)</i>	46,937±2,689 (46,013 - 47,861)	44,691±3,307 (43,674 - 45,709)	0,003
<i>FAZ területe az SCP-ben (μm²)</i>	274,722±86,541 (244,036 - 305,408)	348,511±151,528 (301,292 - 395,731)	0,051
<i>VD a DCP centrumában (%)</i>	19,317±4,632 (17,647 - 20,988)	17,843±5,460 (16,142 - 19,545)	0,236
<i>VD a DCP felső kvadránsában (%)</i>	52,359±3,596 (51,124 - 53,594)	50,483±3,890 (49,255 - 51,710)	0,036
<i>VD a DCP temporális kvadránsában (%)</i>	47,673±3,302 (46,539 - 48,808)	46,485±2,943 (45,568 - 47,402)	0,081
<i>VD a DCP alsó kvadránsában (%)</i>	52,072±2,684 (51,150 - 52,994)	50,924±4,420 (49,529 - 52,319)	0,276
<i>VD a DCP nazális kvadránsában (%)</i>	48,345±3,054 (47,296 - 49,394)	46,855±4,166 (45,557 - 48,154)	0,091
<i>GCL ++ a centrumban (μm)</i>	60,379±11,723 (56,291 – 64,472)	64,901±22,679 (58,310 - 71,475)	0,598
<i>GCL ++ belső gyűrű (μm)</i>	116,904±7,699 (114,218 - 119,591)	109,224±9,628 (106,428 - 112,020)	<0,0001
<i>GCL ++ külső gyűrű (μm)</i>	108,794±6,920 (106,380 - 111,208)	104,972±10,129 (102,031 - 107,913)	0,037
<i>GCL+ a centrumban (μm)</i>	53,235±9,433 (49,944 - 56,526)	55,042±15,612 (50,509 - 59,575)	0,595
<i>GCL + belső gyűrű (μm)</i>	90,941±6,326 (88,734 - 93,148)	83,76±8,009 (81,435 - 86,086)	<0,0001
<i>GCL + külső gyűrű (μm)</i>	67,36±6,803 (64,987 - 69,734)	64,86±5,894 (63,129 - 66,590)	0,152
<i>RNFL vastagság (μm)</i>	106,667±12,504 (102,233 - 111,100)	101,848±10,556 (98,713 - 104,982)	0,060

VD= vaszkuláris denzitás; SCP= szuperficiális kapilláris hálózat; DCP=mély kapilláris hálózat; FAZ=foveoláris avaszkuláris zóna; GCL=ganglionsejt-réteg; RNFL=retinális idegrost réteg; centrum: a centrális 1 mm-ben mért vastagság; belső gyűrű: a centrális 3 mm-ben mért vastagság; külső gyűrű: a centrális 6 mm-ben mért vastagság

[§]Átlag±standard deviáció (95% konfidencia intervallum)

* Mann-Whitney U-teszt

7. Megbeszélés

7.1. Az enyhe COVID-19 betegség mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődmenyei

A SARS-CoV-2 infekciónak az akut megbetegedést követően perzisztáló tünetei lehetnek, ezt hívjuk „hosszú” COVID-nak.¹³⁹ Nath és munkatársai a lehetséges patomechanizmusok között említik a fertőzés által okozott károsodást, a perzisztáló vírus replikációt, a tartós immunaktivációt és a különböző társbetegségek súlyosbodását.¹³⁹ Az akut és a „hosszú” COVID tüneteit autoimmun mechanizmusok, gyulladáscsökkentő válasz, a vírus direkt károsító hatása és a különböző szervek degeneratív elváltozásai magyarázzák.¹³⁹

A belső retina neuronális szövet, így a központi idegrendszerhez hasonlóan a SARS-CoV-2 fertőzés károsíthatja.¹⁴⁰ 2002-2003-ban kimutatták, hogy a SARS-CoV fertőzés centrális és perifériás idegrendszert érintő elváltozásokkal társulhat.¹⁴¹ Az in vivo konfokális mikroszkópiával korai corneális mikrostrukturális és szubbazális idegrost elváltozások mutathatók ki metabolikus betegség esetén még az oftalmoszkópos elváltozások előtt, így a perifériás neuropátia szűrésére alkalmas vizsgálati eljárás lehet.⁶¹ Diabéteszes vékonyrost neuropátia esetén az in vivo konfokális mikroszkópiás eredmények jól korrelálnak a bőr biopszia során nyert adatokkal.¹⁴²

Vizsgálatunk során a poszt-COVID csoportban csökkent idegrost elágazódás denzitást, azaz alacsonyabb számú primer elágazódási pontot találtunk a fő ideg ágon és csökkent teljes idegrost elágazódás denzitást detektáltunk, ami a disztális idegrost ágak vesztését erősítette meg. Szignifikánsan alacsonyabb volt az idegrostok száma is COVID-19 betegséget követően, mely a proximálisabb idegrostok érintettségére utal. Következésképpen szignifikánsan alacsonyabb volt az idegrost terület és az idegrost hossz a poszt-COVID csoportban. Az idegrost szélességben nem volt számottevő különbség a két csoport között. Brines és munkatársai vizsgálták a különböző corneális idegrost paramétereket vékonyrost neuropátia esetén. Arra a következtetésre jutottak, hogy az idegrost denzitásnak, az idegrost területnek, az idegrost hosszának és az idegrost elágazódás sűrűségének a neuropátia diagnózisánál van kiemelt szerepe, míg az idegrost szélesség a súlyosság fokát jelzi.¹⁴³ Az általunk vizsgált poszt-COVID csoportban a normál idegrost szélesség mellett észlelt idegrost károsodás enyhe vékonyrost neuropátiára utalhat.

Mirza és munkacsoportja a SARS-CoV-2 fertőzés alatt neurológiai tünetekről beszámoló betegeknel szignifikánsan alacsonyabb idegrost denzitás, idegrost hossz és idegrost elágazódás sűrűség értéket találtak az idegrendszeri tünetekkel nem rendelkező poszt-COVID és az egészséges csoporttal összehasonlítva.¹⁴⁴

Vizsgáltuk a retinális neurodegeneratív elváltozásokat is. Kvantifikálható neuronális veszteség nem volt detektálható a GCL-RNFL komplex vizsgálatával. Az RNFL és a GCL vastagsága nem mutatott szignifikáns különbséget a két csoport között. Korábbi szerzők sem találtak különbséget a COVID-19 betegségeen átesettek és az egészségesek között a GCL-RNFL komplex paraméterek tekintetében, azonban peripapilláris mikrovaszkuláris érintettséget feltételeztek SARS-CoV-2 infekció esetén.^{145,146}

A szimultán jelen lévő társbetegségek (pl. diabétesz mellitusz és/vagy magas vérnyomás) lehetséges befolyásoló hatása miatt a vizsgált populációban alsó csoport analízist végeztünk, ahol kizártuk a metabolikus betegséggel rendelkező egyéneket. A kapott eredményekben változás nem történt, így az elváltozások nem tulajdoníthatók sem a diabétesz, sem pedig a hipertónia hatásának a poszt-COVID csoportban.

Az angiotenzin-konvertáló enzim-2 (ACE-2) receptor jelen van az epitel sejtek plazma membránján, így exprimálódik a légzőrendszer, a cornea, a retina, az emésztőrendszer, az idegrendszer, a vesék, a herék és a szív szövetében, valamint az endoteliumon.^{147,148,149,150} Az ACE-2 receptor a SARS-CoV-2 tüskefehérjéje számára funkcionális receptornak számít¹⁵¹, a koronavírus felismeri és belépési kapuként használja,¹⁴⁷ így a koronavírus az ACE-2 receptoron keresztül súlyos sokszervi károsodást okozhat.¹⁵² Az ACE-2 receptorok exprimálódnak a retina és a chorioidea különböző sejtípusain, kimutathatók a Müller sejteken, a ganglionsejteken, a fotoreceptor sejteken és a retinális vaszkuláris endotel sejteken is.^{147,150} Korábbi kutatások alapján az ACE-2 receptor szemészeti manifesztációval rendelkező szisztémás vaszkuláris megbetegedések patomechanizmusában is szerepet játszik, mint például a diabéteszes és a hipertenzív retinopátia.¹⁵³ Egy másik tanulmány szerint a SARS-CoV-2 vírus RNS a COVID-19 fertőzésben elhunytak 21%-ánál kimutatható a retina szövetében.¹⁵⁴

Tanulmányunkban a retina kapilláris hálózatának és a choriokapilláris mikrovaszkuláris elváltozásait is vizsgáltuk SARS-CoV-2 infekciót követően. Általánosságban megállapítható, hogy COVID-19 betegséget követően nem találtunk szignifikáns különbséget a vaszkuláris denzitás tekintetében sem a felszínes, sem pedig a mély kapilláris hálózatban az egészséges csoporttal összehasonlítva. Egyedül az SCP

temporális kvadránsában volt szignifikánsan alacsonyabb az érsűrűség COVID-19 betegséget követően. Más szerzők kimutatták, hogy egészséges egyéneknél az SCP vaszkuláris denzitása szignifikánsan csökken a temporális kvadránsban a fovea centrumától mért 2-8 mm közötti területen a periféria felé.¹⁵⁵ Alam és munkatársai szerint diabéteszes betegeknél a temporális perifoveális régió vaszkuláris denzitása a legérzékenyebb a korai retinopátia szempontjából, amit a retina érhálózatának felépítésével magyaráztak.¹⁵⁶ Abrishami és munkatársai 31, COVID-19 betegségen átesett beteget vizsgáltak 2 héttel a felépülést követően és szignifikánsan alacsonyabb foveális és parafoveális érsűrűséget detektáltak a felszínes és a mély kapilláris plexusban az egészséges kontrollokkal összehasonlítva.¹⁵⁷ Savastano és munkatársai az előző vizsgálattal ellentétben nem találtak különbséget a egészséges és a COVID-19 infekción átesett betegek retinális érsűrűsége között.¹⁴⁵ A két vizsgálat közti eltérés hátterében a társbetegségek (immunológiai megbetegedés, elhízás, diabétesz mellitusz és kardiovaszkuláris megbetegedések) hatását feltételezték.¹⁴⁵ Turker és munkatársai 27, kórházi kezelést igénylő, SARS-CoV-2 fertőzésen átesett egyént vizsgáltak az emissziót követő első héten. Szignifikánsan csökkent érsűrűséget detektáltak az SCP felső és nazális, valamint a DCP mind a négy kvadránsában.¹⁵⁰ Egy 12 vizsgálatot elemző metaanalízis a COVID-19 betegségen átesetteknél szignifikánsan csökkent vaszkuláris denzitást talált a DCP-ben, valamint a szignifikancia határát el nem érő FAZ megnyagyobbodást.¹⁵⁸ Ismert, hogy súlyos COVID-19 fertőzés következtében mikrovaszkuláris és tromboembóliás szövődmények alakulhatnak ki, emiatt a látóhártya esteleges mikrovaszkuláris eltéréseinek nyomon követése fokozott figyelmet érdemel. A vaszkuláris szövődmények hátterében disszeminált intravaszkuláris koagulopátia vagy az endotel sejtek vírus fertőzése által okozott érfal gyulladás állhat.¹⁵³

Vizsgálatunkban in vivo konfokális mikroszkóppal különböző fokú corneális szubbazális idegrost morfológiai eltéréseket találtunk PCR teszttel igazolt, enyhe vagy tünetmentes SARS-CoV-2 fertőzésen átesett egyéneknél. OCT angiográfiával releváns retinális mikrovaszkuláris eltérést nem detektáltunk és sem a ganglionsejt-komplex, sem a retinális idegrostréteg vizsgálata nem mutatta optikus neuropátia jelét a poszt-COVID csoportban.

Eredményeink rámutatnak, hogy perifériás neurodegeneratív elváltozások alakulhatnak ki enyhe vagy aszimptomatikus SARS-CoV-2 infekciót követően is. Az in vivo konfokális mikroszkóp alkalmasnak látszik a perifériás neuropátia vizsgálatára SARS-CoV-2 fertőzésen átesett betegeknél.

Vizsgálatunk limitációja az alacsony betegszám és a szemfelszíni betegségek objektív vizsgáló módszerekkel való kizárásának a hiánya.

7.2. A szaruhártya neuroinflammatorikus eltéréseinek vizsgálata SARS-CoV-2 fertőzést követően

Az éretlen dendritikus sejtek jelen vannak a felszíni barrier szövetekben, beleértve a nyálkahártya felszínét, a bőrt és a corneát.^{159,160} Az antigén felismerését követően a dendritikus sejtek érési folyamaton mennek keresztül és az antigénnel való találkozás helyszínéről a limfoid szervekbe vándorolnak, ahol T limfocitákat stimulálnak.¹⁵⁹ A dendritikus sejtek számos útvonalon részt vehetnek a SARS-CoV-2 elleni immunválaszban.¹⁵⁹ Yamagami és munkacsoportja immunhisztokémiai módszerekkel normál humán cornea epitheliumában csontvelő eredetű DC-eket azonosítottak. Vizsgálatukban a dendritikus sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a szaruhártya perifériás részén, mint a centrumban.¹⁶¹ Korábbi szerzők bebizonyították, hogy IVCMMel kapott eredmények kiválóan korrelálnak az immunhisztokémiai vizsgálatokkal a dendritikus sejtek denzitása és érési folyamata tekintetében a humán corneában.^{160,162}

Vizsgálódásunk során szignifikánsan magasabb centrális corneális dendritikus sejt sűrűséget és területet találtunk az enyhe COVID-19 betegségen átesetteknél egészséges kontrollokkal összehasonlítva. A legújabb tanulmányok igazolták, hogy a dendritikus sejtek denzitása jelentősen megemelkedik a corneában különböző megbetegedések esetén, mint például a száraz szem szindróma,^{138,163,164,165,166,167} a corneális graft kilökődés,¹⁶⁸ a „graft-versus-host” betegség,¹⁶⁹ az infekciós eredetű keratitis¹⁷⁰ és a szisztémás autoimmun megbetegedések.^{163,166,167} Egy metaanalízis alapján egészséges egyéneknél a centrális corneában az átlagos dendritikus sejt denzitás $26,4 \pm 13,6$ sejt/mm² (95%-os konfidencia intervallum: 22,5-26,8).³² Vizsgálatunkban a SARS-CoV-2 fertőzésen átesett betegeknél háromszoros DC sűrűséget figyeltünk meg az egészségesekkel összehasonlítva.

Immun-mediált szemfelszíni betegségek esetén („graft-versus-host” betegség) az emelkedett centrális dendritikus sejt sűrűség ($119,29 \pm 79,78$ sejt/mm²) a szemfelszín gyulladását és immunológiai aktivációját jelzi.¹⁶⁹ Korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy a nyúlványokkal rendelkező dendritikus sejtek valószínűleg érettek, míg a dendrit nélküli, kerek sejtek immunológiailag éretlenek.¹⁷¹ Kutatásunk során mind érett dendritikus sejteket, mind pedig éretlen, kerek sejteket azonosítani tudtunk a SARS-CoV-

2 fertőzésen átesettekénél. A centrális corneában a dendritikus sejtek magas számának herpeszes elülső uveitisz esetén differenciál diagnosztikai jelentősége lehet.¹⁷¹

A centrális corneában a dendritikus sejtek denzitásának és morfológiájának tanulmányozása mellett vizsgáltuk a corneális szubbazális idegrostok károsodását SARS-CoV-2 fertőzést követően. A COVID-19 betegségen átesett csoportnál statisztikailag szignifikáns idegrost veszteséget és morfológiai elváltozásokat detektáltunk in vivo konfokális mikroszkópiával. Tepelus és munkatársai száraz szem szindrómában szenvedő betegekénél csökkent corneális idegrost denzitást és emelkedett számú gyulladással DC-t detektáltak, melyből az immunrendszer és a perifériás idegrendszer közötti lehetséges szinergiára következtettek a szaruhártyában¹⁷², amit különböző eredetű fertőzéses keratitiszek esetén már korábban igazoltak.¹⁷³

Bitirgen és munkatársai a corneális DC denzitást és az idegrost morfológiát vizsgálták különböző súlyosságú COVID-19 betegségen átesett egyéneknél.¹⁷⁴ Emelkedett DC sűrűséget és idegrost veszteséget detektáltak attól függetlenül, hogy kialakult-e a betegekénél hosszú COVID-19 szindróma. A különbség kifejezettebb volt azoknál a betegekénél, akiknek neurológiai tünetek is voltak.¹⁷⁴ Vizsgálatunk megerősítette az általuk leírt eltéréseket súlyos fertőzés hiányában is.

A SARS-CoV-2 fertőzésen átesett betegekénél mikroneuromákat azonosítottunk a szubbazális idegi plexusban és a stromális idegekben. A mikroneuromák az idegkárosodás és az ideggeneráció jelei lehetnek.¹⁷⁵ A sérülést követően a proximális idegvégződésből növekedés indul disztális irányba. A regeneráció közben az extraneurálisan növekvő axonok neuromákat formálnak.¹⁷⁵ Ross és munkatársai 3 fő corneális mikroneuroma típust írtak le: a tönk („stump”), a laterális és az orsószzerű mikroneuromát.¹⁷⁶ A perifériás idegi neuromák kialakulásához neuroinflammatorikus folyamatok is hozzájárulnak, ebből következik, hogy a neuroinflammáció gátlása megelőzheti a neuromák kialakulását.¹⁷⁷ A humán corneában szubbazális és stromális mikroneuromákat számos elváltozáshoz kapcsolódóan leírtak korábban, mint például neuropátiás corneális fájdalom,^{176,178} bullózus keratopátia,¹⁷⁹ és keratoplasztikán átesett szemek esetén.¹⁸⁰ A COVID-19 betegséget követően kialakuló corneális mikroneuromákat idegi károsodást okozó gyulladással és immun-mediált folyamatoknak tulajdonítják.¹⁷⁶ Habár a perifériás neuromák gyakran fájdalmasak,¹⁷⁷ egyik COVID-19 betegségen átesett betegünk sem számolt be corneális fájdalomról. További, SARS-CoV-2 infekciót követően kialakuló idegrost morfológiai eltérések közé tartozik a fokozott idegrost tortuozitás, az idegrostok folytonosság megszakítotttsága és gyöngyfűzészerű

megjelenése. Szemfelszíni gyulladáshoz megbetegedések esetén a szubbazális iderostok fokozott tortuozitása a regenerációs folyamatoknak tulajdonítható.¹⁶⁹ Az idegrostok gyöngyfűzészerű megjelenését neuropátiás corneális fájdalomhoz kapcsolódóan írták le, de egészséges egyéneknél is megjelenhet, a szerzők szerint magasabb metabolikus aktivitást jelez.^{178,128}

Barros és munkatársai saját vizsgálatunkhoz hasonló eredményekről számoltak be. A SARS-CoV-2 fertőzésen átesett betegek több, mint 90%-ánál detektáltak a corneális szubbazális plexust érintő elváltozásokat, mint például gyöngyfűzészerű axonokat vagy neuromákat. Kutatásukban DC-k a COVID-19 betegségben átesettek 69,5%-ánál voltak jelen. Szignifikánsan alacsonyabb idegrost denzitást, idegrost hosszt és fraktál dimenziót észleltek a fertőzésen átesetteknél.¹⁸¹

Vizsgálatunkban a corneális bazális epitel sejt, az elülső stroma keratocita és az endotel sejt denzitás nem mutatott szignifikáns változást SARS-CoV-2 fertőzést követően. Alacsonyabb hátsó stroma keratocita sűrűséget detektáltunk a poszt-COVID csoportban. Cukorbeteg felnőtteknél alacsonyabb hátsó stroma keratocita denzitást mutattak ki, mely corneális idegrost veszteséggel társult.¹⁸²

A SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteknél inverz korrelációt találtunk az elülső stroma keratocita denzitás és az idegrost terület között. Statisztikailag szignifikáns korrelációt detektáltunk a dendritikus sejt denzitás és a teljes idegrost elágazódás denzitás között a poszt-COVID csoportban.

Tanulmányunk limitációja, hogy kis számú beteget vizsgáltunk és csak enyhe SARS-CoV-2 fertőzésen átesetteket vontunk be. Továbbá sem elektrodiagnosztikai tesztek, sem bőrbioptizát nem végeztünk a perifériás neuropátia diagnózisának megerősítésére. Egyik csoportban sem végeztünk a száraz szem szindróma kizárására vizsgálatokat, mint például könnyfilm ozmolaritás mérést vagy corneális eszteziometriát.

Tanulmányunk jelentősége, hogy perifériás vékonyrost károsodást tudtunk kimutatni gyulladáshoz dendritikus sejtek jelenléte mellett enyhe COVID-19 betegséget követően. További vizsgálatok szükségesek a SARS-CoV-2 fertőzéshez asszociált corneális neuropátia hosszútávú hatásának és a neuroregeneráció tanulmányozására.

Vizsgálatunk legjelentősebb eredménye, hogy COVID-19 betegséget követően a szaruhártya centrális részében az érett dendritikus sejtek száma megháromszorozódott az egészséges kontrollokkal összehasonlítva. A szubbazális idegrostok szignifikáns csökkenése és megváltozott morfológiája szintén megfigyelhető volt, mint az idegi károsodás és regeneráció indikátora. A szaruhártya sejtszintű és ultrastrukturális

elváltozásai a COVID-19 betegség corneára gyakorolt neuroinflammatorikus hatását erősítik meg.

7.3. A diabétesz mellitusz mikrovaszkuláris és neurodegeneratív szemészeti szövődményeinek vizsgálata

Kutatásunk során diabéteszes retinopátiával nem, vagy csak enyhe nem proliferatív diabéteszes retinopátiával rendelkező cukorbetegéknél vizsgáltuk OCT angiográfia és in vivo konfokális mikroszkópia segítségével, hogy a retinális mikrovaszkuláris vagy a corneális neurodegeneratív elváltozások jelennek-e meg korábban. Megváltozott corneális idegrost morfológiát találtunk diabéteszes betegekben diabéteszes retinopátia hiányában is. Korábbi vizsgálatok szerint az idegrost hossz, ezt követően az idegrost denzitás a legérzékenyebb paraméter a perifériás diabéteszes neuropátia diagnózisára.^{61,183} Brines és munkatársai az idegrost hosszát és az idegrost területét találták a legszenzitívebbnek az enyhe neuropátia kimutatására.¹⁴³ A fraktál dimenzió egy relatívan új paraméter a corneális idegrost morfológia értékelésében, mellyel számszerűsíthető az idegrostok térbeli csökkenése. A fraktál dimenzió alkalmas lehet a különböző etiológiájú neuropátiák elkülönítésére.¹⁸⁴ Egy nemzetközi vizsgálat szerint az in vivo konfokális mikroszkópia alkalmas vizsgáló eljárás a diabéteszes neuropátia kialakulása szempontjából nagy kockázattal rendelkező betegek beazonosítására.¹⁸⁵ Munkacsoportunk korábban fiatal T1DM-es betegekben szignifikánsan alacsonyabb teljes idegrost elágazódás sűrűséget detektált egészséges egyénekekkel összehasonlítva. Az eredmény a vékonyabb, disztálisabb idegágak elsődleges károsodását erősítette meg. Az idegrost területben nem volt szignifikáns különbség a diabéteszes és a kontroll csoport között, feltételezhetően a fő idegág korai megőrzöttsége miatt.⁶² Jelen vizsgálatban az idegrost szélesség nem mutatott szignifikáns különbséget a diabéteszes és az egészséges csoport között, mely eredmény megerősíti azt a korábbi feltevést, hogy a korai károsodás kifejezettebb a disztális idegi ágakban.

Vizsgálatunkban a retinális vaszkuláris denzitás szignifikánsan csökkent az SCP felső, temporális és nazális kvadránsában a diabéteszes csoportban. A DCP-ben egyedül a felső kvadráns érsűrűsége csökkent szignifikánsan a diabétesz mellituszban szenvedőknél. Ong és munkatársai alacsonyabb vaszkuláris denzitást figyeltek meg az SCP-ben súlyos NPDR esetén, mint diabéteszes retinopátiával nem vagy csak enyhe NPDR-el rendelkező diabéteszeseknél, ezt az eltérést a mély kapilláris hálózat területén nem tudták kimutatni.

Arra a következtetésre jutottak, hogy az SCP az érzékenyebb a DR progressziójára, így ott jelentkezik korábban a kapilláris károsodás.¹⁸⁶ Más szerzők hosszú fennállású T2DM esetén igazolták, hogy diabéteszes retinopátia hiányában az érsűrűség csökkenése, valamint a FAZ határának károsodása korábban alakul ki az SCP-ben, mint a DCP-ben.¹⁸⁷ Ezzel ellentétben Kaoual és munkatársai retinális vaszkuláris elváltozásokat írtak le diabéteszes retinopátia hiányában és enyhe NPDR esetén primeren a DCP-ben, melyből arra a következtetésre jutottak, hogy a mély kapilláris plexus a sérülékenyebb diabétesz mellitusban a vaszkuláris elváltozásokra.¹⁸⁸ Saját eredményeinkkel ellentétben, Kirthi és munkatársai prediabéteszes betegeknél a corneális idegrost elváltozásokhoz képest kifejezettebb retinális mikrovaszkuláris károsodásokat találtak, habár a centrális corneában vizsgált idegrost hossz szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott T2DM esetén normoglikémiás alanyokkal összehasonlítva. Rávilágítottak a túlsúly, a derék átmérő és a testtömeg index befolyásoló szerepére a szaruhártya idegrost csökkenésével kapcsolatban.¹⁸⁹

Más szerzőkhöz hasonlóan vizsgálatunk során OCTA-val korai retinális mikrovaszkuláris elváltozásokat azonosítottunk még az oftalmoszkóppal látható elváltozások megjelenése előtt.^{190,191} Ghassemi és munkatársai az SCP parafoveális érsűrűségét a látásromlást előre jelző biomarkerként azonosították diabéteszes betegeknél.¹⁹² Vizsgálatunkban a FAZ területének megnagyobbodását detektáltuk cukorbetegknél. Palma és munkatársai egy összefoglaló tanulmányban az egészségesekhez képest szignifikánsan nagyobb FAZ területet és csökkent vaszkuláris denzitást írtak le diabéteszeseknél még DR hiányában is.¹⁹³ Az általunk vizsgált diabéteszes csoportban a centrális chorioidea vastagsága szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges csoporthoz képest. Torabi és munkacsoportja saját eredményünkhöz hasonlóan T2DM-es betegeknél egészségesekkel összehasonlítva szignifikánsan vékonyabb centrális chorioidea vastagságot találtak, mely eltérés rossz glikémás kontroll mellett kifejezettebb volt.¹⁹⁴ Más szerzők szerint a chorioidea vastagság a diabéteszes retinopátia kezdetén nő, majd a DR progressziójával csökken. Vizsgálatunkban a vastagabb chorioidea jobb látóélességgel járt együtt.⁶

A ganglionsejt-komplex vastagsága szignifikánsan csökkent az általunk vizsgált diabéteszes csoportban. Qiu és munkatársai korrelációt írtak le a ganglion sejtest veszteség, a retinális vaszkuláris elváltozások, valamint a diabéteszes retinopátia súlyossága között.¹⁹⁵ Korábbi kutatások rávilágítottak a neurodegeneratív és a mikrovaszkuláris elváltozások közti összefüggésre diabétesz mellitusz esetén.^{195,196} A GCL és az RNFL vastagság változását korai diabéteszben neuroretinális degenerációként azonosították,

mely előre jelezheti a mikrovaszkuláris károsodást.¹⁹⁶ Egy friss tanulmány szerint az életkor, a diagnóziskori életkor és a diabétesz fennállásának ideje egymástól független rizikófaktorok a makrovaszkuláris szövődményekre T2DM esetén. A mikrovaszkuláris károsodásokkal a betegség fennállás ideje mutatott szoros kapcsolatot, mely összefüggés fiatal életkor esetén kifejezettebb volt.¹⁹⁷ Korrelációs vizsgálatunk megerősítette a fenti eredményt, diabéteszeseknél a betegség fennállás előrehaladtával arányosan csökkent az érsűrűség a felszínes kapilláris hálózat mind a négy kvadránsában, valamint a mély kapilláris plexus alsó és nazális kvadránsában.

Tanulmányunknak néhány limitációja is van. Az első, hogy nehéz elkülöníteni az oki és időbeli kapcsolatot keresztmetszeti vizsgálat esetén, ezért az eredmény nem feltétlenül reprezentatív a teljes diabéteszes populációra vonatkozóan. A második, hogy diabéteszes retinopátiával csak a vizsgálatban részt vevők kis hányada rendelkezett, kívánatos volna nagyobb esetszám bevonása és előrehaladottabb szemfenéki elváltozással rendelkező betegek vizsgálata. A harmadik limitáció, hogy a szemészeti képalkotó vizsgálatokat a betegség lefolyás egy adott pontján végeztük el, diabéteszes betegeknél nehéz meghatározni a betegség kezdetének pontos időpontját. A negyedik, hogy a corneális szubbazális plexusról a pillanatfelvételek kiválasztása manuálisan történt, valamint a képek a szaruhártyának csak egy kis részletét reprezentálják, így a vizsgálat számos szubjektív elemet tartalmaz.

8. Új eredmények összefoglalása

Kutatómunkánk eredményeként az irodalomban elsőként közöltük OCT angiográfiával és in vivo konfokális mikroszkóppal szimultán végzett vizsgálatok adatait a retinális mikrovaszkuláris károsodás és a corneális neurodegeneráció egyidejű kimutatására.

1. Kutatásunk során hospitalizációt nem igénylő, enyhe vagy tünetmentes SARS-CoV-2 infekción átesett, oltatlan betegeknél tanulmányoztuk a mikrovaszkuláris és a neurodegeneratív elváltozásokat. A corneális szubbazális idegrostok paramétereiben szignifikáns csökkenést és megváltozott morfológiát mutattunk ki retinális neurodegeneratív és mikrovaszkuláris eltérések nélkül COVID-19 betegségeen átesetteknél. Összetett vizsgálatunk eredményeként az irodalomban elsőként publikáltuk a corneális és retinális neurodegeneráció és a retinális mikrovaszkuláris eltéréseket és azok összefüggését SARS-CoV-2 fertőzést követően.

2. SARS-CoV-2 fertőzést követően idegi károsodásra és regenerációra utaló jeleket azonosítottunk a szaruhártya szubbazális idegi plexusában. Az infekción átesett betegeknél mikroneuromákat detektáltunk a szubbazális idegi plexusban és a stromális idegek szintjében is. Vizsgálatunkban szignifikánsan magasabb corneális dendritikus sejt sűrűséget és területet találtunk az enyhe COVID-19 betegségeen átesetteknél egészséges kontrollokkal összehasonlítva. Az irodalomban először közöltük a cornea sejtes és ultrastrukturális eltéréseit a SARS-CoV-2 fertőzést követően, melyek a betegség neuroinflammatorikus következményeit demonstrálhatják a szaruhártyában egyéb szemészeti eltérés hiányában.

3. Vizsgálatunk során kimutattuk, hogy a corneális szubbazális idegrost morfológia és a retinális kapilláris sűrűség szignifikánsan megváltozik diabétesz mellitusz esetén még az oftalmoszkóppal látható szemfenéki elváltozások megjelenése előtt. Eredményeink alapján diabétesz mellituszban a corneális idegrostok a retinális mikrovaszkulaturával összehasonlítva korábbi és kifejezettebb károsodást szenvednek. Tudomásunk szerint az irodalomban elsőként publikáltuk a cornea szubbazális idegi

plexusának és látóhártya kapilláris hálózatának egyidejű károsodását ugyanazon betegpopuláción manifest diabétesz esetén.

9. Irodalomjegyzék

1. Helmy YA, Fawzy M, Elasad A, et al. The COVID-19 pandemic: A comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. *J Clin Med.* 2020;9:1-29. doi:10.3390/jcm9041225.
2. Zmasek CM, Lefkowitz EJ, Niewiadomska A, et al. Genomic evolution of the Coronaviridae family. *Virology.* 2022;570:123-133. doi:10.1016/j.virol.2022.03.005.
3. Zeng ZQ, Chen DH, Tan WP, et al. Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses OC43, 229E, NL63, and HKU1: a study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in Guangzhou, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37:363-369. doi:10.1007/s10096-017-3144-z.
4. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* 2020;42:3-11.
5. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses.* 2021;13:1-25. doi:10.3390/v13020202.
6. Wang W, Liu S, Qiu Z, et al. Choroidal thickness in diabetes and diabetic retinopathy: A swept source OCT study. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2020;61:1-9. doi:10.1167/iovs.61.4.29.
7. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5:536-544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z.
8. World Health Organization. WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19—11 March 2020. Available online: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-marc>.
9. World Health Organisation. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard Available online: <https://covid19.who.int/>.
10. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants; 2021. Available online: <https://www.who.int/en/activities/trackingSARS-CoV-2-variants/>.
11. Shaw B, Daskareh M, Gholamrezanezhad · Ali. The lingering manifestations of COVID-19 during and after convalescence: update on long-term pulmonary consequences of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Radiol Med.*

- 2021;126:40-46. doi:10.1007/s11547-020-01295-8.
12. Carfi A, Bernabei R, Landi F. Gemelli Against COVID-19 Post-Acute Care Study Group Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020;324:603-605. doi:10.1001/jama.2020.12528.
 13. Halpin SJ, Mcivor C, Whyatt G, et al. Postdischarge symptoms and rehabilitation needs in survivors of COVID-19 infection: A cross-sectional evaluation. *J Med Virol.* 2021;93:1013-1022. doi:10.1002/jmv.26368.
 14. Zarei M, Bose D, Nouri-Vaskeh M, et al. Long-term side effects and lingering symptoms post COVID-19 recovery. *Rev Med Virol.* 2022;32. doi:10.1002/rmv.2289.
 15. Liguori C, Pierantozzi M, Spanetta M, et al. Subjective neurological symptoms frequently occur in patients with SARS-CoV2 infection. *Brain Behav Immun.* 2020;88:11-16. doi:10.1016/j.bbi.2020.05.037.
 16. Keyhanian K, Umeton RP, Mohit B, et al. SARS-CoV-2 and nervous system: From pathogenesis to clinical manifestation. *J Neuroimmunol.* 2021;350:577436. doi:10.1016/j.jneuroim.2020.577436.
 17. Leonardi M, Padovani A, McArthur JC. Neurological manifestations associated with COVID-19: a review and a call for action. *J Neurol.* 2020;267:1573-1576. doi:10.1007/s00415-020-09896-z.
 18. Copper K, Brann D, Farruggia M, et al. COVID-19 and the Chemical Senses: Supporting Players Take Center Stage. *Neuron.* 2020;107:219-233.
 19. Harapan BN, Yoo HJ. Neurological symptoms, manifestations, and complications associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19). *J Neurol.* 2021;268:3059-3071. doi:10.1007/s00415-021-10406-y.
 20. Dinkin M, Sathi S. Efferent neuro-ophthalmic complications of coronavirus disease 2019. *Curr Opin Ophthalmol.* 2022;33:471-484. doi:10.1097/ICU.0000000000000904.
 21. Azevedo RB, Botelho BG, Hollanda JVG de, et al. Covid-19 and the cardiovascular system: a comprehensive review. *J Hum Hypertens.* 2021;35:4-11. doi:10.1038/s41371-020-0387-4.
 22. Pons S, Fodil S, Azoulay E, et al. The vascular endothelium: The cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. *Crit Care.* 2020;24:4-11. doi:10.1186/s13054-020-03062-7.

23. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19.’ *J Infect.* 2020;80:607-613. doi:10.1016/j.jinf.2020.03.037.
24. Bertoli F, Veritti D, Danese C, et al. Ocular Findings in COVID-19 Patients: A Review of Direct Manifestations and Indirect Effects on the Eye. *J Ophthalmic Vis Res.* 2020;1.9. doi:10.1155/2020/4827304.
25. Amesty MA, Alió del Barrio JL, Alió JL. COVID-19 Disease and Ophthalmology: An Update. *Ophthalmol Ther.* 2020;9:415-426. doi:10.6084/m9.figshare.12265232.
26. Dong J, Chen R, Zhao H, et al. COVID-19 and ocular complications: A review of ocular manifestations, diagnostic tools, and prevention strategies. *Adv Ophthalmol Pract Res.* 2023;3:33-38.
27. Binotti W, Hamrah P. COVID-19-related Conjunctivitis Review: Clinical Features and Management. *Ocul Immunol Inflamm.* 2022. doi:10.1080/09273948.2022.2054432.
28. Güemes-Villahoz, Noemi Burgos-Blasco B, Vidal-Villegas B, Garcia-Feijoo J, et al. Novel Insights into the Transmission of SARS-CoV-2 Through the Ocular Surface and its Detection in Tears and Conjunctival Secretions: A Review. *Adv Ther.* 2020;37:4086-4095. doi:10.6084/m9.figshare.12601931.
29. Meduri A, Oliverio GW, Mancuso G, et al. Ocular surface manifestation of COVID-19 and tear film analysis. *Sci Rep.* 2020;10:20178. doi:10.1038/s41598-020-77194-9.
30. Ozturker ZK. Conjunctivitis as sole symptom of COVID-19: A case report and review of literature. *Eur J Ophthalmol.* 2020. doi:10.1177/1120672120946287.
31. Hamrah P, Huq SO, Liu Y, et al. Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.* 2003;74:172-178. doi:10.1189/jlb.1102544.
32. Mobeen R, Stapleton F, Chao C, et al. Corneal epithelial dendritic cell density in the healthy human cornea: A meta-analysis of in-vivo confocal microscopy data. *Ocul Surf.* 2019;17:753-762. doi:10.1016/j.jtos.2019.07.001.
33. Schimmelpfennig B. Nerve Structures in Human Central Corneal Epithelium. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1982;218:14-20.
34. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: Complications and therapeutics. *Med Sci Monit.* 2006;12:130-147.
35. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus.

- Diabetes Care*. 2010;33:62-69. doi:10.2337/dc10-S062.
36. International Diabetes Federation. Available online:<https://diabetesatlas.org/>.
 37. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, et al. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009;373:2027-2033. doi:10.1016/S0140-6736(09)60568-7.
 38. Martinez L, Zahra T. Chronic Complications of Diabetes. *EMJ Diabet*. 2022. doi:DOI/10.33590/emjdiabet/21-00180.
 39. Zochodne D. Clinical features of diabetic polyneuropathy. In: Elsevier, ed. *Handbook of Clinical Neurology*. 1st ed. Edinburgh; 2014:23-30.
 40. Roszkowska AM, Licitra C, Tumminello G, et al. Corneal nerves in diabetes—The role of the in vivo corneal confocal microscopy of the subbasal nerve plexus in the assessment of peripheral small fiber neuropathy. *Surv Ophthalmol*. 2021;66:493-513. doi:10.1016/j.survophthal.2020.09.003.
 41. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, et al. Prediabetes: A high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 2012;379:2279-2290. doi:10.1016/S0140-6736(12)60283-9.
 42. Turner R. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998;352:837-853. doi:10.1016/S0140-6736(98)07019-6.
 43. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2014. *Diabetes Care*. 2014;37:14-80. doi:10.2337/dc14-S014.
 44. Jeganathan S, Wang J, Wong T. Ocular Associations of Diabetes Other Than Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 2008;31:1905-0912. doi:10.2337/dc08-0342.
 45. Sayin N, Kara N, Pekel G. Ocular complications of diabetes mellitus. *World J diabetes*. 2015;6:92-108. doi:10.4239/wjd.v6.i1.92.
 46. Teo ZL, Tham YC, Yu M, et al. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2021;128:1580-1591. doi:10.1016/J.OPHTHA.2021.04.027.
 47. Vithian K, Hurler S. Microvascular complications: pathophysiology and management. *Clin Med (Northfield Il)*. 2010;10:505-509. doi:10.7861/clinmedicine.10-5-505.

48. Klein R, Klein B, Moss S, et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: II. Prevalence and Risk of Diabetic Retinopathy When Age at Diagnosis Is Less Than 30 Years. *Arch Ophthalmol*. 1984;102:520-526.
49. Varma R, Torres M, Pena F, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in adult Latinos: the Los Angeles Latino eye study. *Ophthalmology*. 2004;111:1298-1306.
50. Xie X, Atkins E, Lv J, et al. Effects of intensive blood pressure lowering on cardiovascular and renal outcomes: Updated systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2016;387:435-443. doi:10.1016/S0140-6736(15)00805-3.
51. Shi R, Zhao L, Wang F, et al. Effects of lipid-lowering agents on diabetic retinopathy: A meta-analysis and systematic review. *Int J Ophthalmol*. 2018;11:287-295. doi:10.18240/ijo.2018.02.18.
52. Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003;110:1677-1682. doi:10.1016/S0161-6420(03)00475-5.
53. Süveges I, Brooser G. A diabetes mellitus szemészeti szövödményei. In: Halmos T, Jermendy G, eds. *Diabetes Mellitus*. Budapest: Medicina; 2002:424-449.
54. Kanski J, Bowling B, eds. Retinal Vascular Disease. In: *Clinical Ophthalmology*. 7th ed. Elsevier; 2011:533-592.
55. Abcouwer SF, Gardner TW. Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1311:174-190. doi:10.1111/nyas.12412.Diabetic.
56. Cheung N, Wong TY. Diabetic retinopathy and systemic vascular complications. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27:161-176. doi:10.1016/j.preteyeres.2007.12.001.
57. Dyck P, Davies J, Wilson D, et al. Risk Factors for Severity of Diabetic Polyneuropathy. *Diabetes Care*. 1999;22:1479-1486.
58. Bikbova G, Oshitari T, Baba T, et al. Diabetic corneal neuropathy: Clinical perspectives. *Clin Ophthalmol*. 2018;12:981-987. doi:10.2147/OPTH.S145266.
59. Zhao H, He Y, Ren YR, et al. Corneal alteration and pathogenesis in diabetes mellitus. *Int J Ophthalmol*. 2019;12:1939-1950. doi:10.18240/ijo.2019.12.17.
60. Ljubimov A V. Diabetic complications in the cornea. *Vision Res*. 2017;139:138-152. doi:10.1016/j.visres.2017.03.002.
61. 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;33:1792-1797. doi:10.2337/dc10-0253.

62. Szalai E, Deák E, Módis L, et al. Early Corneal Cellular and Nerve Fiber Pathology in Young Patients With Type 1 Diabetes Mellitus Identified Using Corneal Confocal Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:853-858. doi:10.1167/iovs.15-18735.
63. Bitirgen G, Ozkagnici A, Malik RA, et al. Corneal nerve fibre damage precedes diabetic retinopathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2014;31:431-438. doi:10.1111/dme.12324.
64. Dehghani C, Pritchard N, Edwards K, et al. Abnormal Anterior Corneal Morphology in Diabetes Observed Using In Vivo Laser-scanning Confocal Microscopy. *Ocul Surf.* 2016;14:507-514. doi:10.1016/j.jtos.2016.07.004.
65. Deák EA, Szalai E, Tóth N, et al. Longitudinal Changes in Corneal Cell and Nerve Fiber Morphology in Young Patients with Type 1 Diabetes with and without Diabetic Retinopathy: A 2-Year Follow-up Study. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60:830-837. doi:10.1167/iovs.18-24516.
66. Sun Z, Yang D, Tang Z, et al. Optical coherence tomography angiography in diabetic retinopathy: an updated review. *Eye.* 2021;35:149-161. doi:10.1038/s41433-020-01233-y.
67. Durham JT, Herman IM. Microvascular Modifications in Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep.* 2011;11:253-264. doi:10.1007/s11892-011-0204-0.
68. Montalvan V, Lee J, Bueso T, et al. Neurological manifestations of COVID-19 and other coronavirus infections: A systematic review. *Clin Neurol Neurosurg.* 2020;194:105921. doi:10.1016/j.clineuro.2020.105921.
69. Song W-C, FitzGerald GA. COVID-19, microangiopathy, hemostatic activation, and complement. *J Clin Invest.* 2020;130:3950-3953. doi:10.1172/JCI140183.
70. Podoleanu AG. Optical coherence tomography. *J Microsc.* 2012;247:209-219. doi:10.1111/j.1365-2818.2012.03619.x.
71. Huang D, Swanson AE, Lin CP, et al. Optical coherence tomography. *Science (80-).* 1991;254:1178-1181. doi:10.1007/978-3-642-27676-7_21.
72. Fujimoto JG, Pitris C, Boppart SA, et al. Optical coherence tomography: An emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy. *Neoplasia.* 2000;2:9-25. doi:10.1038/sj.neo.7900071.
73. Fujimoto JG. Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging. *Nat Biotechnol.* 2003;21:1361-1367. doi:10.1038/nbt892.
74. Somfai GM. Optikai koherencia tomográfia a macula vizsgálatában. In: Németh J,

- ed. *Szemészeti Diagnosztikus Képkeltő Eljárások*. Budapest: Semmelweis Kiadó; 2011:111-127.
75. Takada K, Yokohama I, Chida K NJ. New measurement system for fault location in optical waveguide devices based on an interferometric technique. *Appl Opt*. 1987;26:1603-1606. doi:10.1364/AO.26.001603.
 76. Youngquist RC, Carr S D DE. Optical coherence-domain reflectometry: a new optical evaluation technique. *Opt Lett*. 1987;12:158-160. doi:10.1364/ol.12.000158.
 77. Puliafito CA, Hee MR, Lin CP, et al. Imaging of Macular Diseases with Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology*. 1995;102:217-229. doi:10.1016/S0161-6420(95)31032-9.
 78. Ibrahim MA, Sepah YJ, Symons RCA, et al. Spectral- and time-domain optical coherence tomography measurements of macular thickness in normal eyes and in eyes with diabetic macular edema. *Eye*. 2012;26:454-462. doi:10.1038/eye.2011.293.
 79. Alam S, Zawadzki RJ, Choi S, et al. Clinical Application of Rapid Serial Fourier-Domain Optical Coherence Tomography for Macular Imaging. *Ophthalmology*. 2006;113:1425-1431. doi:10.1016/J.OPHTHA.2006.03.020.
 80. Wojtkowski M, Srinivasan V, Fujimoto JG, et al. Three-dimensional Retinal Imaging with High-Speed Ultrahigh-Resolution Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology*. 2005;112:1734-1746. doi:10.1016/J.OPHTHA.2005.05.023.
 81. Spaide RF, Koizumi H, Pozonni MC. Enhanced Depth Imaging Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Am J Ophthalmol*. 2008;146:496-500. doi:10.1016/j.ajo.2008.05.032.
 82. Mrejen S, Spaide RF. Optical coherence tomography: Imaging of the choroid and beyond. *Surv Ophthalmol*. 2013;58:387-429. doi:10.1016/j.survophthal.2012.12.001.
 83. Potsaid B, Baumann B, Huang D, et al. Ultrahigh speed 1050nm swept source / Fourier domain OCT retinal and anterior segment imaging at 100,000 to 400,000 axial scans per second. *Opt Express*. 2010;18:20029. doi:10.1364/oe.18.020029.
 84. Mansouri K, Medeiros FA, Marchase N, et al. Assessment of Choroidal Thickness and Volume during the Water Drinking Test by Swept-Source Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology*. 2013;120:2508-2516. doi:10.1016/J.OPHTHA.2013.07.040.

85. Franke G, Hillmann D, Bonin T, et al. Common approach for compensation of axial motion artifacts in swept-source OCT and dispersion in Fourier-domain OCT Abstract : *Opt Express*. 2012;20:3432-3434.
86. Asam JS, Polzer M, Tafreshi A, et al. Anterior Segment OCT. In: Bille J, ed. *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology*. Springer; 2019:285-299. doi:10.1007/978-3-030-16638-0.
87. Ang M, Baskaran M, Werkmeister RM, et al. Anterior segment optical coherence tomography. *Prog Retin Eye Res*. 2018;66:132-156. doi:10.1016/j.preteyeres.2018.04.002.
88. Jia Y, Bailey S, Wilson D, et al. Quantitative optical coherence tomography angiography of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2014;121:1435-1444. doi:10.1016/j.ophtha.2014.01.034.
89. Láíns I, Wang JC, Cui Y, et al. Retinal applications of swept source optical coherence tomography (OCT) and optical coherence tomography angiography (OCTA). *Prog Retin Eye Res*. 2021;84. doi:10.1016/j.preteyeres.2021.100951.
90. Rocholz R, Corvi F, Weichsel J, et al. OCT Angiography (OCTA) in Retinal Diagnostics. In: *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology*. Springer International Publishing; 2019:135-160. doi:10.1007/978-3-030-16638-0_6.
91. de Carlo TE, Romano A, Waheed NK, et al. A review of optical coherence tomography angiography (OCTA). *Int J Retin Vitre*. 2015;1:1-15. doi:10.1186/s40942-015-0005-8.
92. Spaide RF, Fujimoto JG, Waheed NK, et al. Image Artifacts in Optical Coherence Angiography. *Retina*. 2015;35:2163-2180. doi:10.1097/IAE.0000000000000765.Image.
93. Kashani AH, Chen CL, Gahm JK, et al. Optical coherence tomography angiography: A comprehensive review of current methods and clinical applications. *Prog Retin Eye Res*. 2017;60:66-100. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.07.002.
94. Gorczyńska I, Migacz J V., Zawadzki RJ, et al. Comparison of amplitude-decorrelation, speckle-variance and phase-variance OCT angiography methods for imaging the human retina and choroid. *Biomed Opt Express*. 2016;7:911-942. doi:10.1364/boe.7.000911.
95. Johnson R, Fu A, McDonald H, et al. Fluorescein Angiography: Basic Principles

- and Interpretation. In: Ryan S, Sadda S, Hinton D, eds. *Retina*. London: Elsevier; 2013:2-50.
96. Nakao S, Yoshida S, Kaizu Y, et al. Microaneurysm Detection in Diabetic Retinopathy Using OCT Angiography May Depend on Intramicroaneurysmal Turbulence. *Ophthalmol Retin.* 2018;2:1171-1173. doi:10.1016/J.ORET.2018.06.001.
 97. Parrulli S, Corvi F, Cozzi M, et al. Microaneurysms visualisation using five different optical coherence tomography angiography devices compared to fluorescein angiography. *Br J Ophthalmol.* 2021;105:526-530. doi:10.1136/bjophthalmol-2020-316817.
 98. Müller LJ, Pels E, Vrensen GFJM. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol.* 2001;85:437-443. doi:10.1136/bjo.85.4.437.
 99. Netter F. *Atlas of Human Anatomy*. Philadelphia: Elsevier; 2006.
 100. Hartnett M. *Pediatric Retina*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
 101. Stone J, van Driel D, Valter K, et al. The locations of mitochondria in mammalian photoreceptors: Relation to retinal vasculature. *Brain Res.* 2008;1189:58-69. doi:10.1016/j.brainres.2007.10.083.
 102. Chan G, Balaratnasingam C, Yu PK, et al. Quantitative morphometry of perifoveal capillary networks in the human retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:5502-5514. doi:10.1167/iovs.12-10265.
 103. Hormel TT, Jia Y, Jian Y, et al. Plexus-specific retinal vascular anatomy and pathologies as seen by projection-resolved optical coherence tomographic angiography. *Prog Retin Eye Res.* 2021;80:100878. doi:10.1016/j.preteyeres.2020.100878.
 104. Provis JM. Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res.* 2001;20:799-821. doi:10.1016/S1350-9462(01)00012-X.
 105. Snodderly DM, Weinhaus RS, Choi JC. Neural-vascular relationships in central retina of macaque monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Neurosci.* 1992;12:1169-1193. doi:10.1523/jneurosci.12-04-01169.1992.
 106. Henkind P. Radial peripapillary capillaries of the retina. I. Anatomy: human and comparative. *Br J Ophthalmol.* 1967;51:115-123. doi:10.1136/bjo.51.2.115.
 107. Nesper PL, Fawzi AA. Human parafoveal capillary vascular anatomy and connectivity revealed by optical coherence tomography angiography. *Investig*

- Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:3858-3867. doi:10.1167/iovs.18-24710.
108. Weale R. Why does the human retina possess a fovea? *Nature.* 1966;212:255-256.
 109. Ishikawa H, Stein DM, Wollstein G, et al. Macular Segmentation with Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:2012-2017. doi:10.1167/iovs.04-0335.
 110. Tan O, Li G, Lu ATH, et al. Mapping of Macular Substructures with Optical Coherence Tomography for Glaucoma Diagnosis. *Ophthalmology.* 2008;115:949-956. doi:10.1016/J.OPHTHA.2007.08.011.
 111. Sambhav K, Grover S, Chalam K V. The application of optical coherence tomography angiography in retinal diseases. *Surv Ophthalmol.* 2017;62:838-866. doi:10.1016/j.survophthal.2017.05.006.
 112. Anvari P, Ashrafkhorasani M, Habibi A, et al. Artifacts in optical coherence tomography angiography. *J Ophthalmic Vis Res.* 2021;16:271-286. doi:10.18502/jovr.v16i2.9091.
 113. De Pretto LR, Moulton EM, Alibhai AY, et al. Controlling for Artifacts in Widefield Optical Coherence Tomography Angiography Measurements of Non-Perfusion Area. *Sci Rep.* 2019;9:1-15. doi:10.1038/s41598-019-43958-1.
 114. Zhang A, Zhang Q, Wang RK. Minimizing projection artifacts for accurate presentation of choroidal neovascularization in OCT micro-angiography. *Biomed Opt Express.* 2015;6:4130. doi:10.1364/boe.6.004130.
 115. Hsu S, Vajzovic L. Identifying artifact in OCT angiography. In: *Handbook of Pediatric Retinal OCT and the Eye-Brain Connection.* Elsevier; 2020:45-54.
 116. Lauermaann JL, Woetzel AK, Treder M, et al. Prevalences of segmentation errors and motion artifacts in OCT-angiography differ among retinal diseases. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2018;256:1807-1816. doi:10.1007/s00417-018-4053-2.
 117. Enders C, Lang GE, Dreyhaupt J, et al. Quantity and quality of image artifacts in optical coherence tomography angiography. *PLoS One.* 2019;14:1-9. doi:10.1371/journal.pone.0210505.
 118. Patel D V., Zhang J, McGhee CNJ. In vivo confocal microscopy of the inflamed anterior segment: A review of clinical and research applications. *Clin Exp Ophthalmol.* 2019;47:334-345. doi:10.1111/ceo.13512.
 119. Minsky M. Memoir on investing the confocal scanning microscope. *Scanning.* 1988;10:128-138.

120. Cavanagh H, Jester J, Essepian J, et al. Confocal microscopy of the living eye. *CLAO*. 1990;16:65-73.
121. Böhnke M, Masters BR. Confocal microscopy of the cornea. *Prog Retin Eye Res*. 1999;18:553-628. doi:10.1016/S1350-9462(98)00028-7.
122. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, et al. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:225-236. doi:10.1136/bjo.87.2.225.
123. Stachs O, Guthoff RF, Aumann S. High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology. *High Resolut Imaging Microsc Ophthalmol*. 2019. doi:10.1007/978-3-030-16638-0.
124. Masters B, Thaer A. Real-time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea. *Appl Opt*. 1994;33:695-701.
125. Stave J, Zinser G, Grümmer G, et al. First results of in vivo visualization of corneal structures with a modified Heidelberg retina tomograph (HRT). *Ophthalmologe*. 2002;99:276-280. doi:10.1007/s003470100535.
126. Cruzat A, Qazi Y, Hamrah P. In Vivo Confocal Microscopy of Corneal Nerves in Health and Disease. *Ocul Surf*. 2017;15:15-47. doi:10.1016/j.jtos.2016.09.004.
127. Schlemm T. Nerven der cornea. *Ammon'Z Ophthalmol*. 1831;1:113-114.
128. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, et al. Corneal nerves: Structure, contents and function. *Exp Eye Res*. 2003;76:521-542. doi:10.1016/S0014-4835(03)00050-2.
129. Dawson D, Ubles J, Edelhauser H. Cornea and sclera. In: Levin L, ed. *Adler's Physiology of the Eye*. 11th ed. Elsevier; 2011.
130. Dabbah MA, Graham J, Petropoulos IN, et al. Automatic analysis of diabetic peripheral neuropathy using multi-scale quantitative morphology of nerve fibres in corneal confocal microscopy imaging. *Med Image Anal*. 2011;15:738-747. doi:10.1016/j.media.2011.05.016.
131. Dabbah MA, Graham J, Petropoulos I, et al. Dual-model automatic detection of nerve-fibres in corneal confocal microscopy images. *Med Image Comput Comput Assist Interv*. 2010;13:300-307. doi:10.1007/978-3-642-15705-9_37.
132. Chen X, Graham J, Dabbah MA, et al. An Automatic Tool for Quantification of Nerve Fibres in Corneal Confocal Microscopy Images. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2017;64:786-794. doi:10.1109/TBME.2016.2573642.
133. Petropoulos IN, Alam U, Fadavi H, et al. Rapid Automated Diagnosis of Diabetic Peripheral Neuropathy With In Vivo Corneal Confocal Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:2071-2078. doi:10.1167/iovs.13-13787.

134. Petropoulos IN, Manzoor T, Morgan P, et al. Repeatability of in vivo corneal confocal microscopy to quantify corneal nerve morphology. *Cornea*. 2013;32:83-89. doi:10.1097/ICO.0b013e3182749419.
135. Chen X, Graham J, Dabbah MA, et al. Small Nerve Fiber Quantification in the Diagnosis of Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy: Comparing Corneal Confocal Microscopy With Intraepidermal Nerve Fiber Density. *Diabetes Care*. 2015;38:1138-1144. doi:10.2337/dc14-2422.
136. Erie JC, Patel S V, McLaren JW, et al. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol*. 2002;134:689-695. doi:10.1016/S0002-9394(02)01698-7.
137. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, et al. Laser scanning in vivo confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:2964-2970. doi:10.1167/iovs.07-0968.
138. Kheirkhah A, Rahimi Darabad R, Cruzat A, et al. Corneal Epithelial Immune Dendritic Cell Alterations in Subtypes of Dry Eye Disease: A Pilot In Vivo Confocal Microscopic Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:7179-7185. doi:10.1167/iovs.15-17433.
139. Nath A. Long-Haul COVID. *Neurology*. 2020;95:559-560. doi:10.1212/WNL.0000000000010640.
140. Pryce-Roberts A, Talaei M, Robertson NP. Neurological complications of COVID-19: a preliminary review. *J Neurol*. 2020;267:1870-1873. doi:10.1007/s00415-020-09941-x.
141. Ellul MA, Benjamin L, Singh B, et al. Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol*. 2020;19:767-783.
142. Basantsova NY, Starshinova AA, Dori A, et al. Small-fiber neuropathy definition, diagnosis, and treatment. *Neurol Sci*. 2019;40:1343-1350.
143. Brines M, Culver DA, Ferdousi M, et al. Corneal nerve fiber size adds utility to the diagnosis and assessment of therapeutic response in patients with small fiber neuropathy. *Sci Rep*. 2018;8:1-11. doi:10.1038/s41598-018-23107-w.
144. Mirza E, Belviranli S, Gundogan AO, et al. Quantitative assessment of the effect of SARS-CoV-2 on the corneal sub-basal nerve plexus of post-COVID-19 patients using in vivo confocal microscopy. *Eye*. 2023;37:660-664. doi:10.1038/s41433-022-02018-1.

145. Savastano MC, Gambini G, Cozzupoli GM, et al. Retinal capillary involvement in early post-COVID-19 patients: a healthy controlled study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2021;1:1-9. doi:10.1007/s00417-020-05070-3.
146. Savastano A, Crincoli E, Savastano M, et al. Peripapillary Retinal Vascular Involvement in Early Post-COVID-19 Patients. *J Clin Med.* 2020;9:2895. doi:10.3390/jcm9092895.
147. Choudhary R, Singh Kapoor M, Singh A, et al. Therapeutic targets of renin-angiotensin system in ocular disorders. *J Curr Ophthalmol.* 2017;29:7-16. doi:10.1016/j.joco.2016.09.009.
148. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med.* 2020;26:681-687. doi:10.1038/s41591-020-0868-6.
149. Kovacs A, Ipsen A, Manzel A, et al. ACE2 drives dendritic cell function and neuroantigen specific immune responses. *Brain Behav Immun.* 2013;29:S19. doi:10.1016/j.bbi.2013.01.058.
150. Turker IC, Dogan CU, Guven D, et al. Optical coherence tomography angiography findings in patients with COVID-19. *Can J Ophthalmol.* 2021;56:83-87. doi:10.1016/j.jcjo.2020.12.021.
151. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003;426:450-454. www.nature.com/nature.
152. Ni W, Yang X, Yang D, et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care.* 2020;24:422. doi:10.1186/s13054-020-03120-0.
153. Landecho MF, Yuste JR, Gándara E, et al. COVID-19 retinal microangiopathy as an in vivo biomarker of systemic vascular disease? *J Intern Med.* 2021;289:116-120. doi:10.1111/joim.13156.
154. Casagrande M, Fitzek A, Püschel K, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Human Retinal Biopsies of Deceased COVID-19 Patients. *Ocul Immunol Inflamm.* 2020;28:721-725. doi:10.1080/09273948.2020.1770301.
155. Lavia C, Mecê P, Nassisi M, et al. Retinal Capillary Plexus Pattern and Density from Fovea to Periphery Measured in Healthy Eyes with Swept-Source Optical Coherence Tomography Angiography. *Sci Rep.* 2020;10:1-11. doi:10.1038/s41598-020-58359-y.
156. Alam M, Zhang Y, Lim JI, et al. Quantitative Optical Coherence Tomography

- Angiography Features for Objective Classification and Staging of Diabetic Retinopathy. *Retina*. 2020;40:322-332. doi:10.1097/IAE.0000000000002373.
157. Abrishami M, Emamverdian Z, Shoeibi N, et al. Optical coherence tomography angiography analysis of the retina in patients recovered from COVID- 19 : a case-control study. *Can J Ophthalmol*. 2021;56:24-30.
158. Kazantzis D, Machairoudia G, Theodossiadis G, et al. Retinal microvascular changes in patients recovered from COVID-19 compared to healthy controls : A meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2023;42:103556. doi:10.1016/j.pdpdt.2023.103556.
159. Borges RC, Hohmann MS, Borghi SM. Dendritic cells in COVID-19 immunopathogenesis: insights for a possible role in determining disease outcome. *Int Rev Immunol*. 2020;40:108-125. doi:10.1080/08830185.2020.1844195.
160. Lagali NS, Badian RA, Liu X, et al. Dendritic cell maturation in the corneal epithelium with onset of type 2 diabetes is associated with tumor necrosis factor receptor superfamily member 9. *Sci Rep*. 2018;8:14248. doi:10.1038/s41598-018-32410-5.
161. Yamagami S, Yokoo S, Usui T, et al. Distinct populations of dendritic cells in the normal human donor corneal epithelium. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:4489-4494. doi:10.1167/iovs.05-0054.
162. Mayer WJ, MacKert MJ, Kranebitter N, et al. Distribution of antigen presenting cells in the human cornea: Correlation of in vivo confocal microscopy and immunohistochemistry in different pathologic entities. *Curr Eye Res*. 2012;37:1012-1018. doi:10.3109/02713683.2012.696172.
163. Tuisku IS, Konttinen YT, Konttinen LM, et al. Alterations in corneal sensitivity and nerve morphology in patients with primary Sjögren's syndrome. *Exp Eye Res*. 2008;86:879-885. doi:10.1016/j.exer.2008.03.002.
164. Lin H, Li W, Dong N, et al. Changes in corneal epithelial layer inflammatory cells in aqueous tear-deficient dry eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:122-128. doi:10.1167/iovs.09-3629.
165. Villani E, Magnani F, Viola F, et al. In vivo confocal evaluation of the ocular surface morpho-functional unit in dry eye. *Optom Vis Sci*. 2013;90:576-586. doi:10.1097/OPX.0b013e318294c184.
166. Marsovszky L, Németh J, Resch MD, et al. Corneal Langerhans cell and dry eye examinations in ankylosing spondylitis. *Innate Immun*. 2014;20:471-477.

- doi:10.1177/1753425913498912.
167. Marsovszky L, Resch MD, Németh J, et al. In vivo confocal microscopic evaluation of corneal Langerhans cell density, and distribution and evaluation of dry eye in rheumatoid arthritis. *Innate Immun.* 2012;19:348-354. doi:10.1177/1753425912461677.
 168. Niederer RL, Sherwin T, McGhee CNJ. In vivo confocal microscopy of subepithelial infiltrates in human corneal transplant rejection. *Cornea.* 2007;26:501-504. doi:10.1097/ICO.0b013e3180318107.
 169. He J, Ogawa Y, Mukai S, et al. In Vivo Confocal Microscopy Evaluation of Ocular Surface with Graft-Versus-Host Disease-Related Dry Eye Disease. *Sci Rep.* 2017;7:10720. doi:10.1038/s41598-017-10237-w.
 170. Mocan MC, Irkec M, Mikropoulos DG, et al. In vivo confocal microscopic evaluation of the inflammatory response in non-epithelial herpes simplex keratitis. *Curr Eye Res.* 2012;37:1099-1106. doi:10.3109/02713683.2012.707270.
 171. Postole AS, Knoll AB, Auffarth GU, et al. In vivo confocal microscopy of inflammatory cells in the corneal subbasal nerve plexus in patients with different subtypes of anterior uveitis. *Br J Ophthalmol.* 2016;100:1551-1556. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307429.
 172. Tepelus TC, Chiu GB, Huang J, et al. Correlation between corneal innervation and inflammation evaluated with confocal microscopy and symptomatology in patients with dry eye syndromes: a preliminary study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2017;255:1771-1778. doi:10.1007/s00417-017-3680-3.
 173. Cruzat A, Witkin D, Baniyadi N, et al. Inflammation and the nervous system: The connection in the cornea in patients with infectious keratitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:5136-5143. doi:10.1167/iovs.10-7048.
 174. Bitirgen G, Korkmaz C, Zamani A, et al. Corneal confocal microscopy identifies corneal nerve fibre loss and increased dendritic cells in patients with long COVID. *Br J Ophthalmol.* 2021:1-7. doi:10.1136/bjophthalmol-2021-319450.
 175. Lundborg G. Nerve regeneration and repair: A review. *Acta Orthop.* 1987;58:145-169. doi:10.3109/17453678709146461.
 176. Ross AR, Al-Aqaba MA, Almaazmi A, et al. Clinical and in vivo confocal microscopic features of neuropathic corneal pain. *Br J Ophthalmol.* 2019;104:768-775. doi:10.1136/bjophthalmol-2019-314799.
 177. Minarelli J, Davis EL, Dickerson A, et al. Characterization of neuromas in

- peripheral nerves and their effects on heterotopic bone formation. *Mol Pain*. 2019;15:1-12. doi:10.1177/1744806919838191.
178. Moein HR, Akhlaq A, Dieckmann G, et al. Visualization of microneuromas by using in vivo confocal microscopy: An objective biomarker for the diagnosis of neuropathic corneal pain? *Ocul Surf*. 2020;18:651-656. doi:10.1016/j.jtos.2020.07.004.
 179. Al-Aqaba M, Alomar T, Lowe J, et al. Corneal nerve aberrations in bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol*. 2011;151:840-849. doi:10.1016/j.ajo.2010.11.013.
 180. Al-Aqaba MA, Otri AM, Fares U, et al. Organization of the regenerated nerves in human corneal grafts. *Am J Ophthalmol*. 2012;153:29-37. doi:10.1016/j.ajo.2011.06.006.
 181. Barros A, Queiruga-Piñeiro J, Lozano-Sanroma J, et al. Small fiber neuropathy in the cornea of Covid-19 patients associated with the generation of ocular surface disease. *Ocul Surf*. 2022;23:40-48. doi:10.1016/j.jtos.2021.10.010.
 182. Kalteniece A, Ferdousi M, Azmi S, et al. Keratocyte Density Is Reduced and Related to Corneal Nerve Damage in Diabetic Neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59:3584-3590. doi:10.1167/iovs.18-23889.
 183. Patel D V., McGhee CNJ. Mapping of the normal human corneal sub-basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:4485-4488. doi:10.1167/iovs.05-0794.
 184. Chen X, Graham J, Petropoulos IN, et al. Corneal nerve fractal dimension: A novel corneal nerve metric for the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59:1113-1118. doi:10.1167/iovs.17-23342.
 185. Perkins BA, Lovblom LE, Lewis EJH, et al. Corneal Confocal Microscopy Predicts the Development of Diabetic Neuropathy: A Longitudinal Diagnostic Multinational Consortium Study. *Diabetes Care*. 2021;44:2107-2114. doi:10.2337/DC21-0476.
 186. Ong JX, Kwan CC, Cicinelli M V., et al. Superficial capillary perfusion on optical coherence tomography angiography differentiates moderate and severe nonproliferative diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2020;15:1-16. doi:10.1371/journal.pone.0240064.
 187. Choi EY, Park SE, Lee SC, et al. Association between clinical biomarkers and optical coherence tomography angiography parameters in type 2 diabetes mellitus. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2020;61:1-8. doi:10.1167/iovs.61.3.4.

188. Kaoual H, Zhioua Braham I, Boukari M, et al. Evaluation of the effect of the severity of diabetic retinopathy on microvascular abnormalities and vascular density using optical coherence tomography angiography. *Acta Diabetol.* 2021;58:1683-1688. doi:10.1007/s00592-021-01774-y.
189. Kirthi V, Reed KI, Alattar K, et al. Multimodal testing reveals subclinical neurovascular dysfunction in prediabetes, challenging the diagnostic threshold of diabetes. *Diabet Med.* 2022;40:1-12. doi:10.1111/dme.14952.
190. De Carlo TE, Chin AT, Bonini Filho MA, et al. Detection of microvascular changes in eyes of patients with diabetes but not clinical diabetic retinopathy using optical coherence tomography angiography. *Retina.* 2015;35:2364-2370. doi:10.1097/IAE.0000000000000882.
191. Ebihara S, Machida S, Hara Y, et al. Relationships between the vascular structure and neural function of the macula in patients with diabetes mellitus. *Jpn J Ophthalmol.* 2021;65:77-88. doi:10.1007/s10384-020-00784-7.
192. Ghassemi F, Fadakar K, Berijani S, et al. Quantitative assessment of vascular density in diabetic retinopathy subtypes with optical coherence tomography angiography. *BMC Ophthalmol.* 2021;21:1-13. doi:10.1186/s12886-021-01831-8.
193. Palma F, Camacho P. The role of Optical Coherence Tomography Angiography to detect early microvascular changes in Diabetic Retinopathy: a systematic review. *J Diabetes Metab Disord.* 2021;20:1957-1974. doi:10.1007/s40200-021-00886-0.
194. Torabi H, Isfeedvajani MS, Ramezani M, et al. Choroidal thickness and hemoglobin A1c levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Ophthalmic Vis Res.* 2019;14:285-290. doi:10.18502/jovr.v14i3.4784.
195. Qiu B, Zhao L, Zhang X, et al. Associations Between Diabetic Retinal Microvasculopathy and Neuronal Degeneration Assessed by Swept-Source OCT and OCT Angiography. *Front Med.* 2021;8:1-14. doi:10.3389/fmed.2021.778283.
196. Mrugacz M, Bryl A, Zorena K. Retinal vascular endothelial cell dysfunction and neuroretinal degeneration in diabetic patients. *J Clin Med.* 2021;10:1-18. doi:10.3390/jcm10030458.
197. Zoungas S, Woodward M, Li Q, et al. Impact of age, age at diagnosis and duration of diabetes on the risk of macrovascular and microvascular complications and death in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2014;57:2465-2474. doi:10.1007/s00125-014-3369-7.

10. Tudományos közlemények és kongresszusi előadások jegyzéke

Értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények:

Kolkedi Z, Csutak A, Szalai E. Analysis of microvascular and neurodegenerative complications of mild COVID-19. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2022 Aug;260(8):2687-2693. doi: 10.1007/s00417-022-05623-8.

IF: 3,535

Kolkedi Z, Csutak A, Szalai E. Corneal Cellular and Neuroinflammatory Changes After SARS-CoV-2 Infection. Cornea. 2022 Jul 1;41(7):879-885. doi: 10.1097/ICO.0000000000003018.

IF: 3,152

Kolkedi Z, Csutak A, Szalai E. Pre-Ophthalmoscopic Quantitative Biomarkers in Diabetes Mellitus. Transl Vis Sci Technol. 2023 Mar 1;12(3):24. doi: 10.1167/tvst.12.3.24.

IF: 3,048

Az értekezés témájában megjelent idézhető absztraktok:

Kölkedi Z, Csutak A, Szalai E. SARS-CoV-2 fertőzés mikrovaszkuláris és neurodegeneratív komplikációi. Szemészet 2022; 159: Suppl I p. 48-49

Szalai E, Kölkedi Z, Csutak A. A szaruhártya neuroinflammatorikus eltérései SARSCoV-2 fertőzést követően. Szemészet 2022; 159: Suppl I p. 48

Kölkedi Z, Csutak A, Szalai E. Analysis of microvascular and neurodegenerative complications of mild COVID-19. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences 2021: Book of Abstracts Pécs, Magyarország: Doctoral Student Association of the University of Pécs 2021; 128: p. 60

Értekezés alapjául szolgáló kongresszusi előadások:

Kölkedi Z, Csutak A, Szalai E. Diabétesz mellitusz mikrovaszkuláris és neurodegeneratív komplikációi. A Magyar Szemorvostársaság 2023. évi Kongresszusa, 2023. június 22-24., Bükfürdő

Kölkedi Z, Csutak A, Szalai E. SARS-CoV-2 fertőzés mikrovaszkuláris és neurodegeneratív komplikációi. A Magyar Szemorvostársaság 2022. évi Kongresszusa, 2022. június 16-18., Bükfürdő

Szalai E, Kölkedi Z, Csutak A. A szaruhártya neuroinflammatorikus eltérései SARSCoV-2 fertőzést követően. A Magyar Szemorvostársaság 2022. évi Kongresszusa, 2022. június 16-18., Bükfürdő

Kölkedi Z, Csutak A, Szalai E. Analysis of microvascular and neurodegenerative complications of mild COVID-19. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (MedPECS), 2021. május 15., Pécs

Egyéb tudományos közlemények:

Kolkedi Z, Csutak A, Szalai E. Ocular Manifestations of Hurler-Scheie Syndrome: Recurrence of Host Disease in the Corneal Transplant. 2022 July. Mol Syndromol. doi.org/10.1159/000525453

IF: 1,494

Kolkedi Z, Csutak A, Szalai E. Bilateral multifocal choroidal osteoma presented with optic disc edema. Indian J Ophthalmol Case Rep 2022; 2:830-1. doi:10.4103/ijjo.IJO_1922_21

Gaál V, Kölkedi Z, Szapáry L, Csutak A, Szalai E. Akut arteria centralis retinae elzáródás; Az ocularis stroke induló terápiás programja. Orv Hetil. 2021 Nov 21;162(47):1871-1875. Hungarian. doi: 10.1556/650.2021.32283.

IF: 0,707

Szalai E, Toth N, Kolkedi Z, Varga C, Csutak A. Comparison of various intraocular lens formulas using a new high-resolution swept-source optical coherence tomographer. J Cataract Refract Surg. 2020 Aug; 46(8):1138-1141. doi: 10.1097/j.jcrs.0000000000000329.

IF: 3,351

Kölkedi Z, Horváth A. Optikai koherencia tomográfia angiográfia jelentősége idiopátiás makuláris teleangiectasia kettős típusa esetén. Esetismertetés. Szemészet 2018; 155: 138-141

Nagy Á, Kölkedi Z, Horváth A, Biró Z. Multifokális chorioiditis esete. Esetismertetés. Szemészet 2018; 155: 121-124

Péntek M, Brodszky V, Biró Z, Kölkedi Z, Dunai Á, Németh J, Baji P, Rencz F, Gulácsi L, Resch MD. Subjective health expectations of patients with age-related macular degeneration treated with antiVEGF drugs. BMC Geriatr. 2017 Oct 10;17(1):233. doi: 10.1186/s12877-017-0619-9.

IF: 2,866

Kölkedi Z, Biró Z. Hurler-Scheie szindróma. Esetismertetés. Szemészet 2017; 154:102-105

Kölkedi Z, Horváth A, Tóth-Kovács K, Pámer Z, Biró Z. Befolyásolják-e életmódbeli tényezők a VEGF-gátló kezelés eredményességét nedves AMD-ben szenvedő betegeknél? Szemészet 2014; 151: 23-27

Kölkedi Z, Tóth-Kovács K, Pámer Z. Életminőség változása VEGF -gátlóval kezelt időskori maculadegenerációban szenvedő betegeknél. Szemészet 2010; 147:133-137

Egyéb idézhető absztraktok:

Kölkedi Z. Időskori szemészeti betegségek és prevenciós lehetőségeik. Idősgyógyászat 8. évfolyam 1-2. szám 2023. március; p. 52

Kölkedi Z, Kovács D, Horváth A, Biró Z. Optikai koherencia tomográfia-angiográfia jelentősége idiopáthiás maculáris teleangiectasia megítélésében. Esetismertetés. Szemészet 2017; 154: Suppl I p. 9

Kölkedi Z, Kovács D, Horváth A, Biró Z. Intravitrealis bevacizumab injekcióval elért eredmények szemfenéki vénás okklúziót követő maculaödémában. Szemészet 2016; 153: Suppl I p. 42

Horváth A, Kölkedi Z, Biró Z. Lucentisre nem reagáló nedves AMD-s betegek Eylea kezelésének eredményei. Szemészet 2015; 152: Suppl I p. 91

Kölkedi Z, Horvath A, Biro Z. The results of intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy in patients with retinal venous occlusion. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015; 56: Paper: 1811

Brodsky N, Péntek M, Biró Z, Kölkedi Z, Dunai Á, Németh J, Gulácsi L, Resch M. Időskori macula degenerációval élő betegek klinikai jellemzői és betegségterhei. Szemészet 2014; 151: Suppl I pp. 59-60.

Horváth A, Kölkedi Z, Pámer Z, Biró Z. Szemfenéki vénás occlusio intravitrealis Avastin injekcióval történő kezelésének eredményei. Szemészet 2014; 151: Suppl I p. 22

Kölkedi Z, Varsányi B, Biró Z. Gyermekkorai traumás maculalyuk - Esetismertetés. Szemészet 2014; 151: Suppl I p. 58

Kölkedi Z, Balogh T, Pámer Z, Biró Z. Hurler-Scheie-szindróma - Esetismertetés. Szemészet 2013; 150: Suppl I p. 93

Kölkedi Z, Tóth-Kovács K, Pámer Z. Befolyásolják-e életmódbeli tényezők a VEGF-gátló kezelés eredményességét nedves AMD-ben szenvedő betegeknél? Szemészet 2012; 149: Suppl I p. 53

Kölkedi Z, Tóth-Kovács K, Horváth A, Pámer Z. Az életminőség változása VEGF - gátlóval kezelt időskori maculadegenerációban szenvedő betegeknél. Szemészet 2011; 148: Suppl I p. 103

Egyéb kongresszusi előadások és poszter prezentációk:

Nagy K, Szalai E, Kölkedi Z, Csutak A. A szaruhártya idegrostjainak morfológiája a COVID-19 fertőzést követően vakcinált és nem vakcinált populációban. A Magyar Szemorvostársaság 2023. évi Kongresszusa, 2023. június 22-24., Bükkfürdő

Patzkó Á, Csutak A, Pfund Z, Tóth N, Kölkedi Z, Kis-Jakab G, Rozgonyi R, Bosnyák E, Szalai E. A cornealis és retinalis neurodegeneráció vizsgálata migrénben. A Magyar Szemorvostársaság 2023. évi Kongresszusa, 2023. június 22-24., Bükkfürdő

Kölkedi Z. Elfogadott terápiai, műtéti eljárások, változó protokollok. AMD továbbképzés, 2022. szeptember 10., Budapest

Kölkedi Z. Időskori szemészeti betegségek és prevenciók lehetőségeik. A Magyar Gerontológiai és Geriátriai Társaság XLI. Kongresszusa és a PTE ÁOK Transzlációs Medicina Intézet közös tudományos konferenciája, 2022. szeptember 30 – október 1., Pécs

Kölkedi Z, Csutak A, Szalai E. Bilaterális chorioidea osteoma papilla oedemával. A Magyar Szemorvostársaság 2021. évi Kongresszusa, 2021. június 4-5. (online)

Kölkedi Z, Csutak A. Nedves AMD-hez kapcsolódó submaculáris vérzés kezelési lehetőségei. A Magyar Szemorvostársaság Retina Szekciójának 2019. évi Kongresszusa, 2019. november 22-23., Győr

Kölkedi Z, Horváth A, Biró Z. Optikai koherencia tomográfia-angiográfia jelentősége idiopáthiás maculáris teleangiectasia megítélésében – Esetismertetés (*poszter*). A Magyar Szemorvostársaság 2017. évi Kongresszusa, 2017. június 22-24., Szeged

Kölkedi Z, Horváth A, Biró Z. Intravitreális bevacizumab injekcióval elért eredmények szemfenéki vénás occlusiot követő macula oedemában. A Magyar Szemorvostársaság 2016. évi Kongresszusa, 2016. június 30 - július 2., Pécs

Kölkedi Z, Kovács D, Horváth A, Biró Z. The results of intravitreal Avastin therapy in patients with retinal venous occlusion (*poszter*). ARVO, 2015. május 3-7., Denver, Colo., USA

Kölkedi Z, Szabó I, Biró Z. Elülső tok zsugorodás – Esetbemutatás. A Magyar Műlencse implantációs és Refraktív Sebészeti Társaság (SHIOL) 2015. évi Kongresszusa, 2015. március 19-21., Balatonalmádi

Horváth A, Kölkedi Z, Biró Z. Lucentisre nem reagáló nedves AMD-s betegek Eylea kezelésének eredményei. A Magyar Szemorvostársaság 2015. évi Kongresszusa, 2015. június 18-20., Pécs

Kölkedi Z, Varsányi B, Biró Z. Gyermekkori traumás maculalyuk- Esetismertetés. A Magyar Szemorvostársaság 2014. évi Kongresszusa, 2014. június 26-28., Pécs

Horváth A, Kölkedi Z, Pámer, Biró Z. Szemfenéki vénás occlusio intravitreális Avastin injekcióval történő kezelésének eredményei. A Magyar Szemorvostársaság 2014. évi Kongresszusa, 2014. június 26-28., Pécs

Brodszky N, Péntek M, Bíró Z, Kölkedi Z, Dunai Á, Németh J, Gulácsi L, Resch M. Időskori macula degenerációval élő betegek klinikai jellemzői és betegségterhei. A Magyar Szemorvostársaság 2014. évi Kongresszusa, 2014. június 26-28., Pécs

Kölkedi Z, Balogh T, Pámer Z, Bíró Z. Hurler-Scheie szindróma- Esetismertetés. A Magyar Szemorvostársaság 2013. évi Kongresszusa, 2014. június 26-28., 2013. június 20-22., Siófok

Kölkedi Z, Tóth-Kovács K, Pámer Z. Befolyásolják-e életmódbeli tényezők a VEGF-gátló kezelés eredményességét nedves AMD-ben szenvedő betegeknél? A Magyar Szemorvostársaság 2012. évi Kongresszusa, 2012. június 7-9., Siófok

Kölkedi Z, Tóth-Kovács K, Horváth A, Pámer Z. Az életminőség változása VEGF-gátlóval kezelt időskori maculadegenerációban szenvedő betegeknél. A Magyar Szemorvostársaság 2011. évi Kongresszusa, 2011. június 16-18., Siófok

Elsőszerzős közlemények összesített impakt faktora: 11,229

Társszerzős közlemények impakt faktorával kiegészített összesített impakt faktor: 18,153

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Csutak Adrienne Professzornőnek, a PTE KK Szemészeti Klinika intézetvezető egyetemi tanárának, hogy a kutatások elvégzéséhez szükséges háttérrel megteremtette és a doktori értekezésem elkészítését intézetében lehetővé tette.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szalai Eszter egyetemi adjunktusnak a közös munkát. A kutatást mindvégig aktívan segítette és mind az elméleti, mind a gyakorlati kérdésekben sokoldalú tanáccsal látott el, támogatott, és az értekezés összeállításában is nélkülözhetetlen segítséget nyújtott.

Köszönöm a Szemészeti Klinika minden dolgozójának a betegek kiválasztása és vizsgálata során nyújtott lelkiismeretes segítséget.

Köszönetet mondok a PTE OGYDHT Doktori Iskola munkatársainak a tanulmányaim során tanúsított segítőkészségükért és kedvességükért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak a türelmet és a támogatást, mely nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.



Analysis of microvascular and neurodegenerative complications of mild COVID-19

Zsofia Kolkedi¹ · Adrienne Csutak¹ · Eszter Szalai¹

Received: 16 November 2021 / Revised: 19 February 2022 / Accepted: 9 March 2022 / Published online: 19 March 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Purpose To examine retinal and corneal neurodegenerative and retinal microvascular changes in patients after mild or asymptomatic COVID-19 disease compared to age-matched controls.

Methods Thirty-five (35) patients after PCR-proven SARS-CoV-2 infection and 28 age-matched controls were enrolled. Swept-source optical coherence tomography (OCT), OCT angiography, and in vivo corneal confocal microscopy were performed in both groups. Corneal subbasal nerve plexus was quantified. Vessel density for superficial (SCP) and deep capillary plexus (DCP) and structural OCT parameters were recorded.

Results Significantly lower nerve branch density ($P=0.0004$), nerve fiber area ($P=0.0001$), nerve fiber density ($P=0.0009$), nerve fiber length ($P<0.0001$), and total nerve branch density ($P=0.002$) values were observed in patients after COVID-19 compared to healthy controls. VD of the temporal SCP was significantly different between the two groups ($P=0.019$). No other SCP and DCP vessel density parameter differed significantly between the two groups.

Conclusions Our results suggest that peripheral neurodegenerative changes may occur even after mild or asymptomatic SARS-CoV-2 infection. No relevant microvascular changes were seen with OCT angiography and structural OCT parameters did not show any signs of optic neuropathy in post-COVID patients. In vivo confocal microscopy seems to be an important tool in monitoring peripheral neuropathy in patients after COVID-19.

Keywords COVID-19 · In vivo confocal microscopy · Neuropathy · OCT angiography

Key messages

- Advances in ophthalmic imaging allow for quantification of retinal vessel density and for characterization of the optic nerve head as well as measurement of the corneal peripheral nerves.
- Different degrees of corneal subbasal nerve fiber morphology alterations were observed with in vivo confocal microscopy in patients who had PCR-proven mild or asymptomatic SARS-CoV-2 infection.
- No relevant microvascular changes were seen with OCT angiography and structural GCL- RNFL complex parameters did not show any signs of optic neuropathy in post-COVID patients.

Introduction

COVID-19 caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) may cause a spectrum of symptoms ranging from fever and mild dyspnea to severe respiratory failure and some death [1]. The disease is known to have various ophthalmic manifestations including ocular surface

✉ Eszter Szalai
szalai.eszter@pte.hu

¹ Department of Ophthalmology, University of Pécs Medical School, Rákóczi u. 2, 7623 Pécs, Hungary

involvement, uveitis, retinal damage, and neuroophthalmological complications [2, 3]. One-third of the previously hospitalized patients reported persistent COVID-19-related symptoms and half of them suffered from long-standing symptoms after hospital discharge [4].

Ophthalmologists have traditionally been able to directly observe and analyze the small vessels and cranial nerve II (optic nerve) on fundus examination. Recently, advances in imaging allow for quantification of vessel density and for the characterization of the optic nerve head as well as measurement of the corneal peripheral nerves (branches from the ophthalmic division of the trigeminal nerve). Thus, a comprehensive ophthalmic examination can provide general information on the vascular system and peripheral nerves in any systemic diseases.

General (fatigue, decreased exercise tolerance, breathlessness) and neuropsychological consequences (anxiety/depression, psychological distress) have been commonly reported in SARS survivors [5]. The microvascular and neurodegenerative complications of multisystemic diseases secondary to SARS-CoV-2 infection have been gaining more scientific attention [6, 7]. The purpose of this research was to examine retinal and corneal neurodegenerative and retinal microvascular changes with noninvasive clinical methods in patients who had mild COVID-19 disease.

Material and methods

Sixty-three (63) subjects were prospectively enrolled from the Department of Ophthalmology, University of Pecs; 35 patients after PCR-proven SARS-CoV-2 infection with mild disease presentation and 28 age- and sex-matched controls were also enrolled. Control subjects had no past or current history of any systemic or ocular diseases and no participant in either group had a history of contact lens wear or intraocular surgery. In both study groups, research protocol included visual acuity measurement, slit lamp examination, intraocular pressure measurement, and anterior and posterior (dilated) segment imaging, with anterior (Anterior; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) and posterior segment (Topcon DRI OCT Triton Swept source OCT, Topcon, Japan) optical coherence tomography (OCT), OCT angiography (OCTA), and in vivo confocal microscopy (Heidelberg Retina Tomograph II Rostock Cornea Module; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany). All participants provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and the study was approved by the University of Pecs Institutional Ethical Review Board (number: 8672-PTE 2021).

All study subjects underwent in vivo imaging of the subbasal nerve fibers of the cornea. In brief, a drop of topical anesthetic (oxybuprocaine 0.4%) was applied to the subjects' eye and viscous Vidisic gel (Bausch and Lomb, Berlin, Germany)

was applied in a disposable sterile polymethylmethacrylate cap (Tomo-Cap; Heidelberg Engineering GmbH), which was placed over the objective lens. In both study groups, one eye was chosen randomly for the image analysis.

Three good-quality images of the subbasal nerve plexus were selected and analyzed by using ACCMetrics software V3 (University of Manchester, Manchester, UK) [8–13]. Corneal nerve fiber density (NFD), the number of nerve fibers/mm²; nerve branch density (NBD), the number of primary branch points on the main nerve fibers/mm²; nerve fiber length (NFL), the total length of nerves mm/mm²; nerve fiber total branch density (TBD), the total number of branch points/mm²; nerve fiber area (NFA), the total nerve fiber area mm²/mm²; and nerve fiber width (NFW), the average nerve fiber width mm/mm², were calculated.

OCT and OCTA were performed for retinal structural and microvascular imaging, using swept-source OCT, DRI OCT Triton plus (Topcon, Tokyo, Japan). All OCT and OCTA images were acquired by well-trained examiner. OCTA imaging was performed with 3 mm × 3 mm volumetric scans centered at the fovea containing 320 × 320 A-scans. Low-quality OCTA images or presence of motion artifacts was excluded from the study. We used the automated layer segmentation for SCP and DCP using the built-in software segmentation algorithm (IMAGeNet 6 Version 1.26.16898, Topcon). The superficial capillary plexus (SCP) was delineated by 2.6 μm below internal limiting membrane to 15.6 μm below the junction between inner plexiform layer (IPL) and inner nuclear layer (INL), for deep capillary plexus (DCP), 15.6 μm below IPL/INL to 70.2 μm below IPL/INL. For each layer, the vessel density (VD) was automatically provided by IMAGeNet software. The quadrant VD (superior, inferior, nasal, and temporal) was analyzed using an Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) grid containing the two inner rings. Foveal avascular zone (FAZ) was manually outlined by the same trained observer. Structural OCT was performed by using SMARTTrack HD Raster centered at the macula (6.0 × 6.0 mm) and 3D Disc program (6.0 × 6.0 mm) centered at the optic nerve head. From the automated segmentation OCT map, the retinal nerve fiber layer thickness (RNFL), the ganglion cell complex thickness (GCL +, GCL ++), and central choroidal thickness were evaluated. The analysis of the OCTA images was carefully reviewed by two independent examiners.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using MedCalc Version 14.8.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium) and IBM SPSS Statistics 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY). Results are described as mean ± standard deviation (SD), and

95% confidence interval (CI) for the mean. The Kolmogorov–Smirnov test was used to test whether our data were normally distributed. For pairwise comparison, independent samples *t* test was performed. For bivariate correlation analysis, Pearson correlation test was applied. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Thirty-five (35) eyes of 35 COVID-19 patients (18 males and 17 females, mean age: 43.3 ± 13.8 years, range 21–67 years) and 28 eyes of 28 age-matched healthy subjects (11 males and 17 females, mean age: 46.7 ± 17.6 years, range 20–67 years) were studied, and no significant difference was found between the two groups regarding age (*P* = 0.388) and sex (*P* = 0.345). The mean time between the first positive PCR test and the ophthalmic examination was 13.5 ± 6.1 weeks (between 2 and 26 weeks). Active and persistent symptoms included fever in 17 patients (49%), dysgeusia/anosmia in 13 patients

(37%), fatigue in 11 cases (31%), coughing in 11 patients (31%), joint pain in 11 cases (31%), insomnia in 2 patients (6%), depression in 1 patient (3%), and tachycardia/palpitation in 1 patient (3%). Six patients (17%) reported ophthalmic symptoms during the infection, such as burning of the eye, foreign body sensation, orbital, and ocular pain. Three (3) subjects (9%) were completely asymptomatic during the disease. In the post-COVID group, 6 patients had well-controlled type 2 diabetes mellitus, 6 patients had hypertension (5 patients had both diabetes mellitus and hypertension), and 1 patient had a prior history of central retinal vein occlusion on the contralateral eye. No patient had any signs of retinopathy on the study eye.

There was no statistically significant difference in ocular biometry measurements between the healthy and post-COVID subjects (Table 1). Significantly lower NBD (*P* = 0.0004), NFA (*P* = 0.0001), NFD (*P* = 0.0009), NFL (*P* < 0.0001), and TBD (*P* = 0.002) values were observed in patients after COVID-19 compared to healthy controls (Fig. 1) (Table 2). There was no significant difference in NFW between the two groups (*P* = 0.421).

Table 1 Ocular biometry in healthy subjects compared to patients after COVID-19

	Healthy subjects [§]	Patients after COVID-19 [§]	<i>P</i> *:
Anterior K1(D)	40.48 ± 1.763 (42.768–44.192)	42.828 ± 1.335 (42.354–43.301)	0.125
Anterior K2 (D)	44.203 ± 1.950 (43.415–44.991)	44.04 ± 2.117 (43.290–44.791)	0.737
Astigmatism (D)	0.74 ± 0.433 (0.565–0.915)	0.855 ± 0.4187 (0.706–1.003)	0.454
CCT (μm)	539.87 ± 29.579 (527.079–552.661)	545.848 ± 40.987 (531.315–560.382)	0.510
Internal ACD (mm)	2.785 ± 0.564 (2.557–3.013)	2.973 ± 0.440 (2.817–3.129)	0.148
WTW (mm)	11.826 ± 0.405 (11.658–11.993)	12.029 ± 0.383 (11.891–12.167)	0.062
LT (mm)	4.122 ± 0.318 (3.993–4.250)	4.208 ± 0.438 (4.048–4.369)	0.421
AL (mm)	23.43 ± 1.045 (22.923–23.767)	23.822 ± 1.043 (23.452–24.192)	0.087

K, keratometry; *CCT*, central corneal thickness; *ACD*, anterior chamber depth; *WTW*, white-to-white; *LT*, lens thickness; *AL*, axial length

[§]Mean ± standard deviation (95% confidence interval)

*Independent sample *t* test

Fig. 1 Analyzed image of the corneal subbasal nerve plexus using ACCMetrics software (red: fiber, blue: branch, green: branch point). **A** Normal nerve fiber morphology of a 69-year-old healthy subject; **B** decreased nerve fiber density and altered morphology of a 69-year-old patient after COVID-19

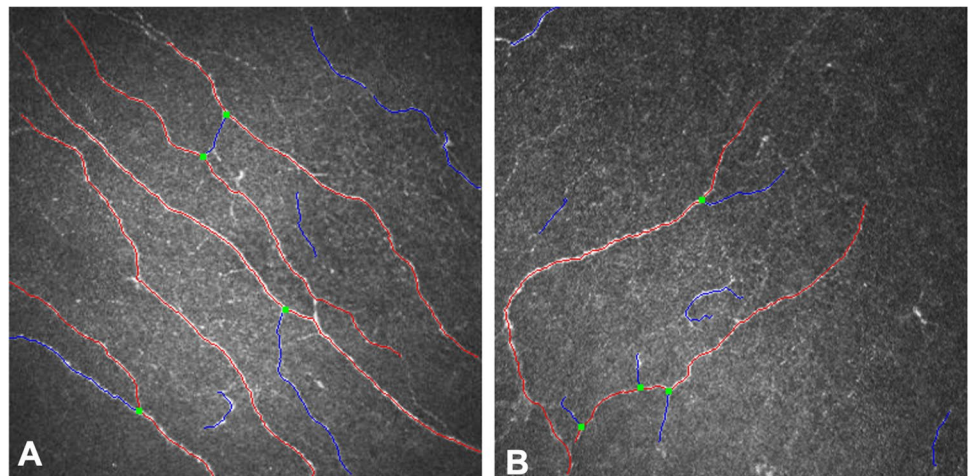


Table 2 Corneal nerve fiber morphology of healthy subjects compared to patients after COVID-19

	Healthy subjects [§]	Patients after COVID-19 [§]	<i>P</i> *
Nerve branch density (No/mm ²)	23.63 ± 15.940 (17.449–29.810)	10.542 ± 11.350 (6.518–14.567)	0.0004
Nerve fiber area (mm ² /mm ²)	0.006 ± 0.002 (0.005–0.007)	0.004 ± 0.002 (0.003–0.004)	0.0001
Nerve fiber density (No/mm ²)	18.57 ± 6.114 (16.200–20.941)	11.742 ± 8.649 (8.675–14.809)	0.0009
Nerve fiber length (mm/mm ²)	12.98 ± 3.141 (11.763–14.198)	8.605 ± 3.649 (7.311–9.899)	< 0.0001
Nerve fiber width (mm/mm ²)	0.022 ± 0.0017 (0.0211–0.0224)	0.022 ± 0.002 (0.021–0.023)	0.421
Nerve fiber total branch density (No/mm ²)	37.20 ± 20.415 (29.284–45.116)	21.937 ± 16.424 (16.113–27.760)	0.002

[§]Mean ± standard deviation (95% confidence interval)

*Independent samples *t* test

Table 3 Optical coherence tomography (OCT) and OCT angiography parameters in healthy subjects compared to patients after COVID-19

	Healthy subjects [§]	Patients after COVID-19 [§]	<i>P</i> *
Central choroidal thickness (μm)	304.769 ± 81.420 (271.883–337.656)	269.941 ± 79.458 (242.217–297.665)	0.101
VD of SCP CSF (%)	21.363 ± 5.248 (19.328–23.398)	22.931 ± 5.137 (21.139–24.723)	0.241
VD of SCP superior (%)	51.32 ± 2.357 (50.406–52.234)	50.546 ± 3.010 (49.496–51.596)	0.272
VD of SCP temporal (%)	48.526 ± 2.666 (47.492–49.560)	47.166 ± 1.761 (46.551–47.780)	0.019
VD of SCP inferior (%)	50.916 ± 3.312 (49.632–52.201)	50.714 ± 2.649 (49.775–51.654)	0.792
VD of SCP nasal (%)	47.154 ± 2.899 (46.030–48.278)	46.254 ± 1.974 (45.565–46.943)	0.153
SCP FAZ area (μm)	267.907 ± 83.553 (234.854–300.959)	252.822 ± 199.750 (210.361–295.284)	0.582
VD of DCP CSF (%)	19.065 ± 3.688 (17.575–20.555)	18.764 ± 5.437 (16.836–20.691)	0.810
VD of DCP superior (%)	52.071 ± 3.682 (50.644–53.499)	53.006 ± 3.688 (51.719–54.293)	0.324
VD of DCP temporal (%)	47.941 ± 3.768 (46.480–49.403)	47.115 ± 2.420 (46.271–47.959)	0.300
VD of DCP inferior (%)	52.011 ± 2.814 (50.920–53.102)	52.943 ± 3.253 (51.808–54.078)	0.444
VD of DCP nasal (%)	48.594 ± 3.096 (47.393–49.794)	47.776 ± 3.815 (46.445–49.107)	0.365
GCL + CSF (μm)	52.481 ± 8.116 (49.271–55.692)	61.353 ± 25.830 (52.340–70.366)	0.091
GCL + inner ring (μm)	116.454 ± 7.325 (113.556–119.351)	114.992 ± 12.067 (110.782–119.203)	0.582
GCL + outer ring (μm)	108.731 ± 6.822 (106.033–111.430)	117.809 ± 65.197 (95.061–140.557)	0.475
GCL + CSF (μm)	52.481 ± 8.116 (49.271–55.692)	61.353 ± 25.830 (52.340–70.366)	0.091
GCL + inner ring (μm)	90.417 ± 6.189 (87.968–92.865)	100.338 ± 40.810 (86.099–114.578)	0.216
GCL + outer ring (μm)	67.778 ± 6.402 (65.245–70.310)	74.279 ± 34.012 (62.412–86.147)	0.332
RNFL total thickness (μm)	108.269 ± 10.850 (103.887–112.652)	103.235 ± 12.524 (98.865–107.605)	0.108

VD, vessel density; SCP, superficial capillary plexus; DCP, deep capillary plexus; FAZ, foveal avascular zone; GCL, ganglion cell layer; RNFL, retinal nerve fiber layer; CSF, thickness within central 1 mm; inner ring, thickness within central 3 mm; outer ring, thickness within central 6 mm

[§]Mean ± standard deviation (95% confidence interval)

*Independent samples *t* test

Central choroidal thickness was higher in the normal group but no statistically significant difference was found between the two groups ($P=0.101$) (Table 3). VD of the temporal SCP was significantly different between the two groups ($P=0.019$). No other SCP and DCP VD parameter differed significantly between the two groups (Table 3). RNFL thickness was higher in the normal subject but none of the RNFL-GCL complex parameters showed significant difference between normal and post-COVID subjects (Table 3).

After excluding patients with metabolic diseases from the post-COVID group, a significant decrease was observed in NBD ($P=0.0002$), NFA ($P=0.0001$), NFD ($P=0.0001$), NFL ($P<0.0001$), and TBD ($P=0.0023$). NFW did not differ significantly between the two groups ($P=0.206$). No statistically significant difference was observed in VD parameters of the SCP and DCP ($P=0.102–0.894$); only a borderline significant decrease was found in the temporal SCP VD ($P=0.051$) in the post-COVID group.

Statistically significant correlation was found between NFW and nasal VD in SCP ($r=0.618$, $P=0.0001$) and DCP ($r=0.679$, $P=0.0001$) in the normal group. There was a significant inverse correlation between NFW and nasal VD in DCP ($r=-0.391$, $P=0.027$) in the post-COVID group. No other statistically significant correlation was found between the corneal nerve fiber morphology and OCT angiography parameters. The time between the first positive PCR and ophthalmic examination did not show significant correlation with any of the measured parameters ($P>0.05$).

Discussion

It has been reported that many patients after the acute phase of the SARS-CoV-2 infection have persistent neurologic and autonomic symptoms. This has recently been referred to as “long-haul” COVID [14]. Objective testing and comprehensive examinations of the nonspecific symptoms in these patients have typically been inconclusive. Nath A. proposed the potential pathophysiologic mechanisms for long-haul COVID including residual damage from the infection, persistent virus replication, constant immune activation, and comorbidities [14]. Autoimmune events, inflammatory response or direct damage, and degenerative changes of different organs could explain some of the symptoms of acute and long-haul disease [14]. The inner retina is a neuronal tissue and may also be injured by SARS-CoV-2 as has been reported for the central nervous system [15]. In 2002–2003, SARS-CoV was found to be associated with occasional disease of the central and peripheral nervous system [16].

It has been shown that in vivo confocal microscopy could reveal early corneal microstructural and subbasal nerve fiber changes in patients with metabolic diseases before the development of ophthalmoscopic changes; thus, it might be an applicable tool for peripheral neuropathy screening [17]. In the post-COVID group, we identified decreased number of primary branch points on the main nerve fibers (NBD) and lower total number of branch points confirming distal loss of nerve branches (NTBD) with normal nerve fiber width (NFW). There was a significant reduction in the number of nerve fibers (NFD) reflecting the more proximal nerves after COVID-19. Consequently, a significantly decreased total nerve fiber area (NFA) was seen in the post-COVID group. Retinal neurodegeneration was also examined. Quantification of neuronal loss was obtained by studying the GCL-RNFL complex. RNFL thickness did not show significant difference between the healthy and post-COVID subjects. Previous authors observed no difference between post-COVID and normal subjects in structural parameters of GCL-RNFL complex; however, they assumed microvascular peripapillary involvement in SARS-CoV-2 infection [18, 19]. Due to the possible confounding effect of co-existing

systemic diseases (e.g., diabetes mellitus and/or hypertension) in the study population, we performed a subset analysis by excluding patients with metabolic disorders. It did not alter our final results, so changes were not attributable to either diabetes or hypertension in the post-COVID group.

SARS-CoV-2 coronavirus recognizes and uses angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) receptor to enter into different cells [20]. ACE-2 receptor is expressed in the retina and choroid and on different cell types such as the Müller cells, ganglion cells, photoreceptor cells, and the retinal vascular endothelial cells [20, 21]. Thus, it is involved in the pathogenesis of systemic vascular diseases including diabetic and hypertensive retinopathy [22]. In addition, SARS-CoV-2 viral RNA was detected in the retina in 21% of deceased COVID-19 patients [23].

We also studied microvascular changes in the retinal capillary network and choriocapillaris after SARS-CoV-2 infection. In general, we did not observe significant difference in vascular density either in SCP or in DCP when compared to the healthy group. Only VD of the temporal SCP decreased significantly in patients after COVID-19. In healthy subjects, VD of the SCP showed significant decrease from the foveal center, with a 51% loss on the temporal side measured with swept-source OCTA [24]. In diabetic patients, VD in the temporal perifoveal region was the most sensitive for early detection of retinopathy which was explained by the anatomic arrangement of the retinal vasculature [25]. Abrishami et al. evaluated 31 patients 2 weeks after recovery from COVID-19 and detected a statistically significant lower foveal and parafoveal vascular density both in SCP and DCP compared to a retrospective healthy cohort [26]. They presumed it to be explained by the higher prevalence of comorbidities (immunological diseases, obesity, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases) [18]. Similar findings, however, were also found with OCTA in a cohort of young post-COVID patients without pre-existing systemic conditions [26]. Microvascular injury and thrombotic events were reported in patients with severe COVID-19 which draw the attention to the importance of qualifying and quantifying retinal microvascular involvement with OCTA [26].

In our study, different degrees of corneal subbasal nerve fiber morphology alterations could be detected with in vivo confocal microscopy in patients who had PCR-proven mild or asymptomatic SARS-CoV-2 infection. No relevant microvascular changes were seen with OCT angiography and structural GCL-RNFL complex parameters did not show any signs of optic neuropathy in post-COVID patients. Our results suggest that peripheral neurodegenerative changes may occur even after mild or asymptomatic SARS-CoV-2 infection. In vivo confocal

microscopy seems to be an important tool in monitoring peripheral neuropathy in patients after COVID-19. Further investigations are needed to examine microvascular and neurodegenerative changes in patients after severe SARS-CoV-2 infections and to monitor the regeneration process of the affected peripheral nerves.

Author contribution The authors confirm contribution to the paper as follows: study conception and design: ZK, ES, AC; data collection: ZK; analysis and interpretation of results: ZK, ES; draft manuscript preparation: ZK, ES; supervision and review of the manuscript: ES, AC. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Funding Open access funding provided by University of Pécs. This work was supported by PTE AOK-KA-2021–14.

Data availability Not applicable.

Code availability Not applicable.

Declarations

Ethics approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the University of Pécs, Medical School, and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards (University of Pécs Institutional Ethical Review Board approval number: 8672-PTE 2021.)

Consent to participate Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Consent for publication Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Shaw B, Daskareh M, Gholamrezanezhad A (2021) The lingering manifestations of COVID-19 during and after convalescence: update on long-term pulmonary consequences of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Radiol Medica* 126:40–46. <https://doi.org/10.1007/s11547-020-01295-8>
- Bertoli F, Veritti D, Danese C et al (2020) Ocular findings in COVID-19 patients: a review of direct manifestations and indirect effects on the eye. *J Ophthalmol* 2020:4827304. <https://doi.org/10.1155/2020/4827304>
- Amesty MA, Alió del Barrio JL, Alió JL (2020) COVID-19 Disease and ophthalmology: an update. *Ophthalmol Ther* 9:415–426. <https://doi.org/10.1007/s40123-020-00260-y>
- Carfi A, Bernabei R, Landi F (2020) Gemelli against COVID-19 post acute care study group. Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA - J Am Med Assoc* 324:603–605. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1985>
- Halpin SJ, McIvor C, Whyatt G et al (2021) Postdischarge symptoms and rehabilitation needs in survivors of COVID-19 infection: a cross-sectional evaluation. *J Med Virol* 93:1013–1022. <https://doi.org/10.1002/jmv.26368>
- Montalvan V, Lee J, Bueso T et al (2020) Neurological manifestations of COVID-19 and other coronavirus infections: a systematic review. *Clin Neurol Neurosurg* 194:105921
- Song W, FitzGerald GA (2020) COVID-19, microangiopathy, hemostatic activation, and complement. *J Clin Invest* 130:3950–3953
- Dabbah MA, Graham J, Petropoulos IN et al (2011) Automatic analysis of diabetic peripheral neuropathy using multi-scale quantitative morphology of nerve fibres in corneal confocal microscopy imaging. *Med Image Anal* 15:738–747. <https://doi.org/10.1016/j.media.2011.05.016>
- Dabbah MA, Graham J, Petropoulos I et al (2010) Dual-model automatic detection of nerve-fibres in corneal confocal microscopy images. *Med Image Comput Comput Assist Interv* 13:300–307. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15705-9_37
- Chen X, Graham J, Dabbah MA et al (2017) An automatic tool for quantification of nerve fibres in corneal confocal microscopy images HHS Public Access. *IEEE Trans Biomed Eng* 64:786–794. <https://doi.org/10.1109/TBME.2016.2573642>
- Petropoulos IN, Alam U, Fadavi H et al (2014) Rapid automated diagnosis of diabetic peripheral neuropathy with in vivo corneal confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:2071–2078. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13787>
- Petropoulos IN, Manzoor T, Morgan P et al (2013) Repeatability of in vivo corneal confocal microscopy to quantify corneal nerve morphology. *Cornea* 32:83–89. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3182749419>
- Chen X, Graham J, Dabbah MA et al (2015) Small nerve fiber quantification in the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy: comparing corneal confocal microscopy with intraepidermal nerve fiber density. *Diabetes Care* 38:1138–1144. <https://doi.org/10.2337/dc14-2422>
- Nath A (2020) Long-Haul COVID. *Neurology* 95:559–560. <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000010640>
- Pryce-Roberts A, Talaei M, Robertson NP (2020) Neurological complications of COVID-19: a preliminary review. *J Neurol* 267:1870–1873
- Ellul MA, Benjamin L, Singh B, Lant S, Michael BD, Easton A, Kneen R, Defres S, Jim Sejvar TS (2020) Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol* 19:767–783
- Tavakoli M, Quattrini C, Abbott C et al (2010) Corneal confocal microscopy A novel noninvasive test to diagnose and stratify the severity of human diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 33:1792–1797. <https://doi.org/10.2337/dc10-0253>
- Savastano MC, Gambini G, Cozzupoli GM et al (2021) Retinal capillary involvement in early post-COVID-19 patients: a healthy controlled study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1:1–9. <https://doi.org/10.1007/s00417-020-05070-3>
- Savastano A, Crincoli E, Savastano M et al (2020) Peripapillary retinal vascular involvement in early post-COVID-19 patients. *J Clin Med* 9:2895. <https://doi.org/10.3390/jcm9092895>

20. Choudhary R, Kapoor MS, Singh A, Bodakhe SH (2017) Therapeutic targets of renin-angiotensin system in ocular disorders. *J Curr Ophthalmol* 29:7–16
21. Turker IC, Dogan CU, Guven D et al (2021) Optical coherence tomography angiography findings in patients with COVID-19. *Can J Ophthalmol* 56:83–87. <https://doi.org/10.1016/j.jcjo.2020.12.021>
22. Landecho MF, Yuste JR, Gándara E et al (2021) COVID-19 retinal microangiopathy as an in vivo biomarker of systemic vascular disease? *J Intern Med* 289:116–120. <https://doi.org/10.1111/joim.13156>
23. Casagrande M, Fitzek A, Püschel K et al (2020) Detection of SARS-CoV-2 in human retinal biopsies of deceased COVID-19 patients. *Ocul Immunol Inflamm* 28:721–725. <https://doi.org/10.1080/09273948.2020.1770301>
24. Lavia C, Mecê P, Nassisi M et al (2020) Retinal capillary plexus pattern and density from fovea to periphery measured in healthy eyes with swept-source optical coherence tomography angiography. *Sci Rep* 10:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58359-y>
25. Alam M, Zhang Y, Lim JI et al (2020) Quantitative optical coherence tomography angiography features for objective classification and staging of diabetic retinopathy. *Retina* 40:322–332. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000002373>
26. Abrishami M, Emamverdian Z, Shoeibi N, Omidtabrizi A (2021) Optical coherence tomography angiography analysis of the retina in patients recovered from COVID-19: a case-control study. *Can J Ophthalmol* 56:24–30

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Corneal Cellular and Neuroinflammatory Changes After SARS-CoV-2 Infection

Zsafia Kolkedi, MD, Adrienne Csutak, MD, PhD, and Eszter Szalai, MD, PhD

Purpose: The purpose of this study was to evaluate corneal cellular and ultrastructural changes and to quantify the neuroinflammatory process in patients after mild severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection.

Methods: Thirty patients after SARS-CoV-2 infection and 41 age-matched controls were examined. All subjects underwent in vivo confocal microscopy of the corneal cell layers and subbasal nerve fibers with the Heidelberg Retina Tomograph II. Semiautomated analysis of basal epithelial, anterior and posterior stromal keratocyte, and endothelial cell density was performed. Dendritic cell (DC) density and area were also calculated, and subbasal nerve plexus morphology was analyzed.

Results: The posterior stromal keratocyte density was significantly lower in patients after SARS-CoV-2 infection ($P = 0.0006$). DC density in the central cornea was significantly higher in patients after SARS-CoV-2 infection ($P = 0.0004$). There was a significant difference in the DC area between the 2 groups ($P < 0.0001$). Significantly altered subbasal nerve fiber morphology was detected in patients after SARS-CoV-2 infection compared with healthy volunteers ($P < 0.05$).

Conclusions: Corneal cellular and ultrastructural changes demonstrated in this study suggest neuroinflammatory consequences of COVID-19 in the cornea in the absence of ophthalmoscopic alterations.

Key Words: COVID-19, dendritic cells, in vivo confocal microscopy, subbasal nerves

(*Cornea* 2022;41:879–885)

The ocular surface is highly exposed to a range of environmental factors and infectious diseases. The tear film is of importance in virus replication and transmission in

cases of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2).¹ A high prevalence of ocular surface manifestations has been reported in patients with SARS-CoV-2 infections.^{2,3}

Besides epithelial cells, stromal keratocytes and endothelial cells, a diverse group of antigen-presenting cells, can be identified in the healthy cornea including dendritic cells (DCs) and macrophages.⁴ DCs are a heterogeneous population of bone marrow–derived antigen-presenting cells and have pivotal role in both innate immunity and adaptive immunity.⁵ Corneal DCs reside in the level of basal epithelium and subbasal nerve plexus.⁶ In cases of infectious and inflammatory disease or trauma, large numbers of DC are recruited from the peripheral cornea and migrated into the central cornea.⁵ Experimental models confirmed the maturation and phenotypic changes of resident epithelial DCs on inflammation.⁴

In vivo confocal microscopy (IVCM) has been shown to identify early corneal microstructural changes in patients with metabolic diseases even in the absence of other ophthalmic or systemic manifestations.^{7,8} IVCM is able to provide qualitative and quantitative analysis of peripheral nerves and inflammatory cells in both healthy and inflamed corneas. The purpose of this study was to evaluate corneal cellular and ultrastructural changes and to quantify the neuroinflammatory process in patients after mild SARS-CoV-2 infection.

MATERIAL AND METHODS

Study Participants

Seventy-one subjects were enrolled in this study at the Department of Ophthalmology, University of Pécs: 30 patients after polymerase chain reaction–proven SARS-CoV-2 infection and 41 age-matched controls. Control subjects were selected from patients presenting for routine ophthalmic examination without any history of systemic diseases such as diabetes mellitus, rheumatic diseases, or connective tissue disorders. Patients after SARS-CoV-2 infection were excluded from the analysis if they had any pre-existing general disorder including metabolic and cardiovascular diseases. No subject in either group had a past or current history of ocular disease, contact lens wear, or intraocular surgery. Ophthalmological examination included slitlamp examination, ophthalmoscopy, intraocular pressure measurement, and IVCM.

Received for publication August 2, 2021; revision received December 13, 2021; accepted January 31, 2022. Published online ahead of print March 17, 2022.

From the Department of Ophthalmology, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary.

Supported by PTE ÁOK-KA-2021-14.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.corneajrnl.com).

Correspondence: Eszter Szalai, MD, PhD, Department of Ophthalmology, University of Pécs Medical School, Rákóczi u. 2, 7623 Pécs, Hungary (e-mail: szalai.eszter@pte.hu).

Copyright © 2022 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

All subjects provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and this study was approved by the Institutional Ethics Committee.

IVCM Examination

All study subjects underwent bilateral imaging of the corneal cell layers and subbasal nerve fibers of the cornea with the Heidelberg Retina Tomograph II Rostock Cornea Module (HRT II RCM; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) by an experienced examiner (E.S.), as described previously.⁹ Topical anesthetic eye drop (tetracaine hydrochloride 0.4%) was applied to the subjects' eyes, and viscous Vidisic Gel (Bausch & Lomb, Berlin, Germany) was used in a disposable sterile polymethylmethacrylate cap (Tomo-Cap; Heidelberg Engineering GmbH), which was placed over the objective lens. One eye of each subject was chosen randomly for statistical analysis.

Semiautomated Image Analysis of Corneal Cells

Three good quality images from each eye were selected by another examiner (Z.K.) to reduce observer bias. The instrument-based software was used to analyze the cell count of the basal epithelium, anterior and posterior stroma, and endothelium by the same masked examiner (Z.K.). The average of 3 measurements was used for comparative analysis. The basal epithelium was defined as the first 3 clear scans anterior to the Bowman layer, anterior stroma was defined as the first 3 images posterior to the Bowman layer, and posterior stroma was defined as the first 3 images immediately anterior to Descemet membrane.^{10,11} On the epithelial, keratocyte, and endothelial layer scan, a region of interest containing at least 50 cells was selected, the cells were marked manually, and the software automatically calculated cell densities (cells per square millimeter). DCs in the central corneal epithelium were also counted manually, and DC density was calculated automatically by the instrument-based software.

To measure the DC area on IVCM images, the Set Scale, Threshold, and ROI Manager functions of ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health, Bethesda, MD) were used.¹² First, the scale was set to 50 μm based on the original IVCM image. Then, the

threshold function was applied to highlight the DCs. The ROI Manager with the tracing tool was used to mark each DC. The area of 10 DCs in 3 images for each subject was analyzed.¹² Only mature DCs with branches were included in the cell count and cell area measurements. All cell density and cell area parameters were assessed by 2 independent examiners to prevent bias, and the masked examiner's measurements were used for comparative analysis.

Image Analysis of the Corneal Subbasal Nerve Plexus

Three good quality images of the subbasal nerve plexus were selected and analyzed using ACCMetrics software version 3 (University of Manchester, Manchester, United Kingdom), as reported previously.⁹ Corneal nerve fiber density (the number of nerve fibers per square millimeter), nerve branch density (the number of primary branch points on the main nerve fibers per square millimeter), nerve fiber length (the total length of nerves millimeters per square millimeter), nerve fiber total branch density (the total number of branch points per square millimeter), nerve fiber area (the total nerve fiber area square millimeter per square millimeter), and nerve fiber width (the average nerve fiber width millimeter per square millimeter) were calculated. Other morphological changes of the nerve fibers were recorded including microneuromas,¹³ tortuosity, discontinuity of the subbasal nerve fibers, and beading of the stromal nerves.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using MedCalc version 14.8.1 (MedCalc Software byba, Ostend, Belgium) and GraphPad Prism version 9.1.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). The results are described as mean ± SD and 95% confidence interval for the mean. The Kolmogorov–Smirnov test was used to test normality. For pairwise comparison, the independent or paired sample *t* test (for normally distributed data) and the Mann–Whitney *U* test or Wilcoxon test (for not Gaussian distribution) were performed. For bivariate correlation analysis, the Pearson correlation test was applied. A *P* value ≤0.05 was considered statistically significant.

TABLE 1. Corneal Microstructural Alterations in Patients After SARS-CoV-2 Infection Compared With Healthy Volunteers

	Patients After SARS-CoV-2 Infection*	Healthy Volunteers*	<i>P</i> †
Epithelial cell density (cells/mm ²)	7631.158 ± 1065.082 (7117.805–8144.511)	8147.677 ± 1069.327 (7796.198–8499.156)	0.091
Anterior stromal keratocyte cell density (cells/mm ²)	273.48 ± 83.566 (238.986–307.974)	281.932 ± 82.186 (254.918–308.946)	0.693
Posterior stromal keratocyte cell density (cells/mm ²)	190.667 ± 77.541 (141.399–239.934)	251.195 ± 36.514 (238.840–263.550)	0.0006
Endothelial cell density (cells/mm ²)	2937.0 ± 313.080 (2438.819–3435.181)	3116.551 ± 537.523 (2931.905–3301.196)	0.519
DC density (cells/mm ²)	90.367 ± 105.325 (51.038–129.696)	27.049 ± 38.316 (14.955–39.143)	0.0004
DC area (μm ²)	47.139 ± 6.539 (44.498–49.780)	34.161 ± 8.367 (30.707–37.615)	<0.0001

*Mean ± SD (95% confidence interval).

†Independent samples *t* test, Mann–Whitney *U* test.

Downloaded from <http://journals.lww.com/corneajrnl> by BIDM/SePH/Kav1zEumr1CINda+kJLhEZgbsHh04XM10hCj wCX1AWNyQp/IIqHID3I3D00dR/7VTSFI4C/3V/C4/OAVpDda8K2+YagH515KE= on 05/06/2023

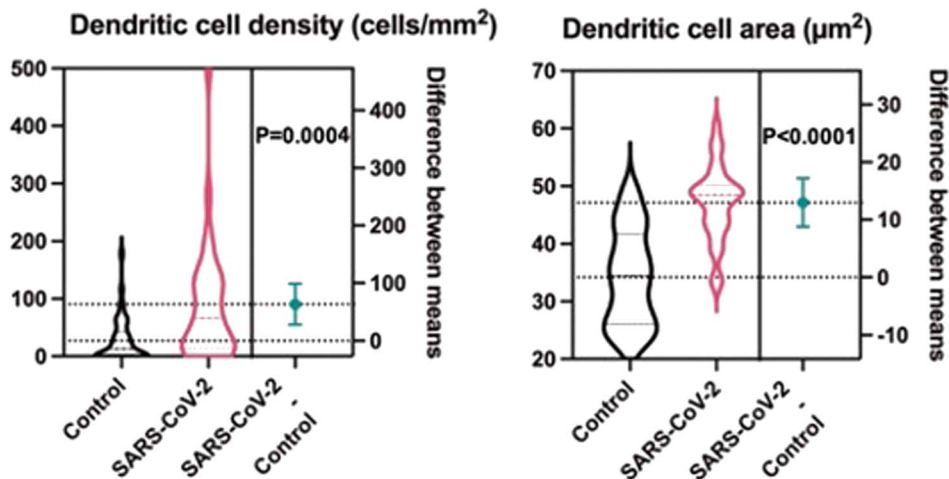


FIGURE 1. Violin plot showing the differences in DC density and area between control individuals and patients after SARS-CoV-2 infection. (The full color version of this figure is available at www.corneajrnl.com.)

RESULTS

Thirty eyes of 30 patients after SARS-CoV-2 infection (16 male patients and 14 female patients, mean age: 41.8 ± 13.63 years, range 21–66 years) and 41 eyes of 41 age-matched healthy volunteers (22 male patients and 19 female patients, mean age: 47.98 ± 19.28 years, range 19–74 years) were studied; no significant difference was observed in age ($P = 0.140$) and sex ($P = 0.979$) between the 2 groups. The mean time between polymerase chain reaction–proven diagnosis and ophthalmic examination was 13.93 ± 6.13 weeks (between 3 and 26 weeks). During the SARS-CoV-2 infection, no patient required hospitalization. All patients experienced mild symptoms, including anosmia, dysgeusia, cough, fever, fatigue, and joint and muscle ache during the disease course. None of the patients reported ocular complaints other than slight worsening of the pre-existing dryness. Slitlamp examination did not reveal any ocular surface and anterior segment abnormality; no fluorescein staining was seen in any subjects.

There was no significant difference in the epithelial ($P = 0.091$), endothelial ($P = 0.519$), and anterior stromal keratocyte cell density ($P = 0.693$) between the 2 groups

(Table 1; see Supplemental Fig. 1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ICO/B371>). The posterior stromal keratocyte density was significantly lower in patients after SARS-CoV-2 infection ($P = 0.0006$). DC density in the central cornea was significantly higher in patients after SARS-CoV-2 infection ($P = 0.0004$) (Fig. 1). There was a significant difference in the DC area between the 2 groups ($P < 0.0001$) (Fig. 1). Hyperreflective round inflammatory cells without dendrites were also identified after SARS-CoV-2 infection (Fig. 2). No statistically significant difference was found between 2 examiners in either group ($P = 0.114–0.966$).

Significantly altered subbasal nerve fiber morphology was detected in patients after SARS-CoV-2 infection compared with healthy volunteers for all parameters except nerve fiber width that did not differ significantly between the 2 groups ($P = 0.116$) (Table 2 and Fig. 3). Six patients after SARS-CoV-2 infection demonstrated subbasal and stromal microneuromas. Other alterations observed on IVCN included increased subbasal nerve tortuosity, discontinuity of the nerve fibers, and apparent beading of the stromal nerves (Fig. 4).

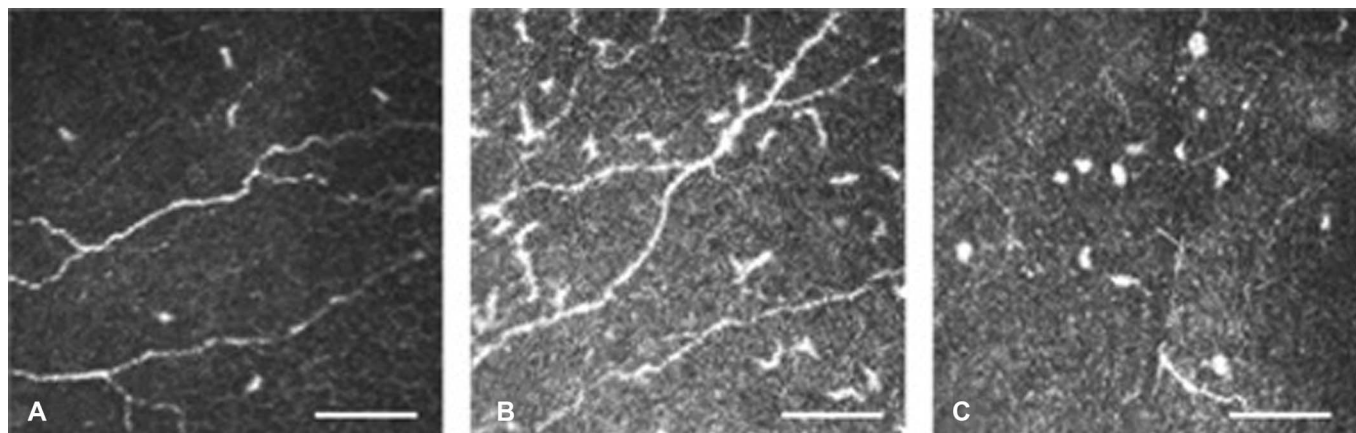


FIGURE 2. Scattered DCs in the central basal epithelium in a healthy volunteer (A). Higher density of DCs after SARS-CoV-2 infection (B). Hyperreflective inflammatory cells without dendrites after SARS-CoV-2 infection (C). The scale bar represents 50 μm .

Downloaded from <http://journals.lww.com/corneajrnl> by BHD/MSepHKav1zEoum1tQINa+kULhEZgbsH04XMionCj wCX1AWNvQp/1lQHD3i3D00dRy7/TVSfIAC/3Vc4/OAVpDa8K2+YagH515KE= on 05/06/2023

TABLE 2. Subbasal Nerve Plexus Morphology in Patients After SARS-CoV-2 Infection Compared With Healthy Volunteers

	Patients After SARS-CoV-2 Infection*	Healthy Volunteers*	P†
Nerve fiber density (No. per mm ²)	11.249 ± 6.758 (8.726–13.773)	16.493 ± 7.589 (13.999–18.987)	0.004
Nerve branch density (No. per mm ²)	9.86 ± 9.522 (6.305–13.416)	21.936 ± 15.827 (16.659–27.213)	0.0005
Nerve fiber length (mm per mm ²)	8.509 ± 3.358 (7.255–9.763)	11.532 ± 4.152 (10.221–12.842)	<0.0001
Nerve fiber total branch density (No. per mm ²)	22.186 ± 18.25 (15.372–29.001)	34.868 ± 21.884 (27.961–41.776)	0.008
Nerve fiber area (mm ² /mm ²)	0.004 ± 0.002 (0.003–0.005)	0.006 ± 0.002 (0.005–0.006)	0.002
Nerve fiber width (mm per mm ²)	0.023 ± 0.003 (0.022–0.024)	0.022 ± 0.002 (0.021–0.023)	0.116

*Mean ± SD (95% confidence interval).

†Independent samples *t* test, Mann–Whitney *U* test.

Statistically significant correlation was found between DC count and nerve fiber total branch density ($r = 0.479$, $P = 0.008$) after COVID-19. An inverse correlation was observed between DC density and area ($r = -0.427$, $P = 0.030$) in patients after SARS-CoV-2 infection. There was a general significant correlation between each nerve fiber parameter ($P \leq 0.05$) after COVID-19. Anterior keratocyte density showed an inverse correlation with the nerve fiber area ($r = -0.498$, $P = 0.011$). No other statistically significant correlation was found between corneal nerve fiber morphology and cell density in any cellular layer.

DISCUSSION

Angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 is a homolog of ACE and can be expressed in a variety of human tissues and cells, including the plasma membrane of corneal epithelial cells and different endothelial cells.^{14,15} ACE2 is a specific functional receptor for spike glycoprotein of SARS-CoV-2,¹⁶ and ACE2 is believed to be associated with severe multiorgan damage in COVID-19.¹⁷ ACE2 is expressed on DCs that can be infected by SARS-CoV-2.¹⁸ There are several proposed routes of participation of DCs in the immune response against SARS-CoV-2.¹⁹ Immature DCs

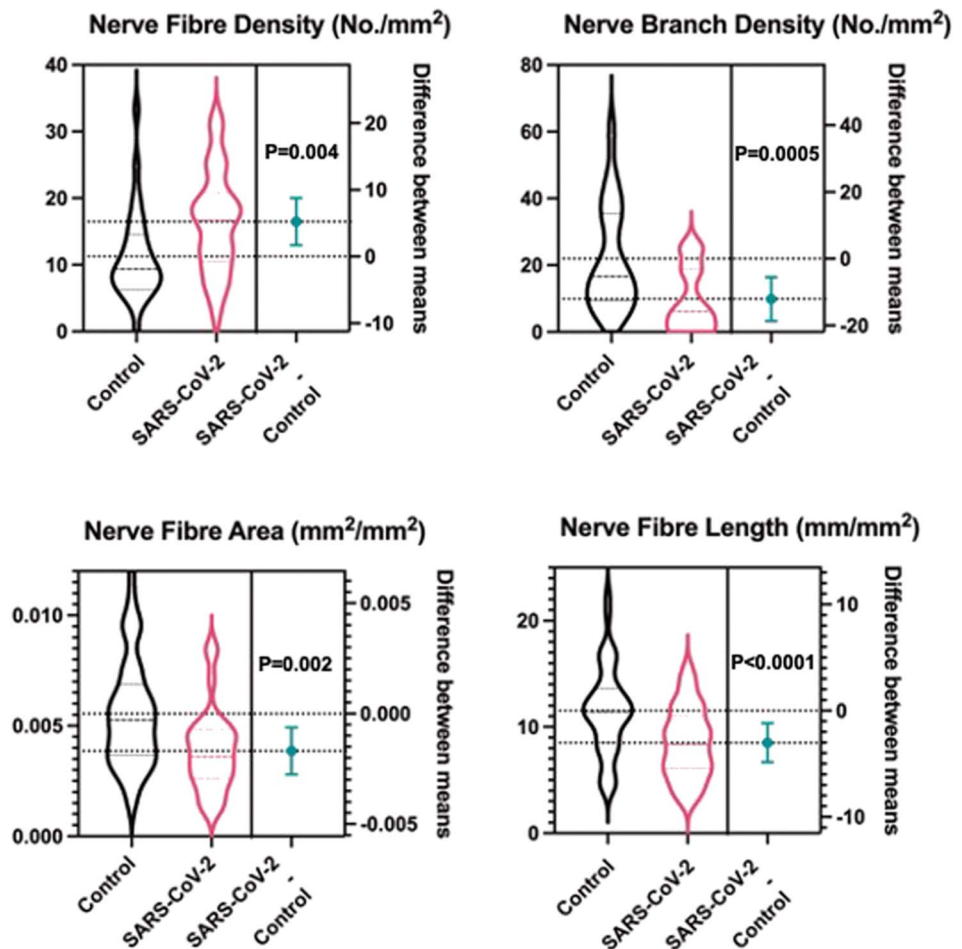


FIGURE 3. Violin plot showing the differences in subbasal nerve fiber morphology parameters between control individuals and patients after SARS-CoV-2 infection. (The full color version of this figure is available at www.corneajrnl.com.)

Downloaded from <http://journals.lww.com/corneajrnl> by BHD/MSep/HKav1zEoum/10ANda+kULHEZgbsH04XMM10nCy

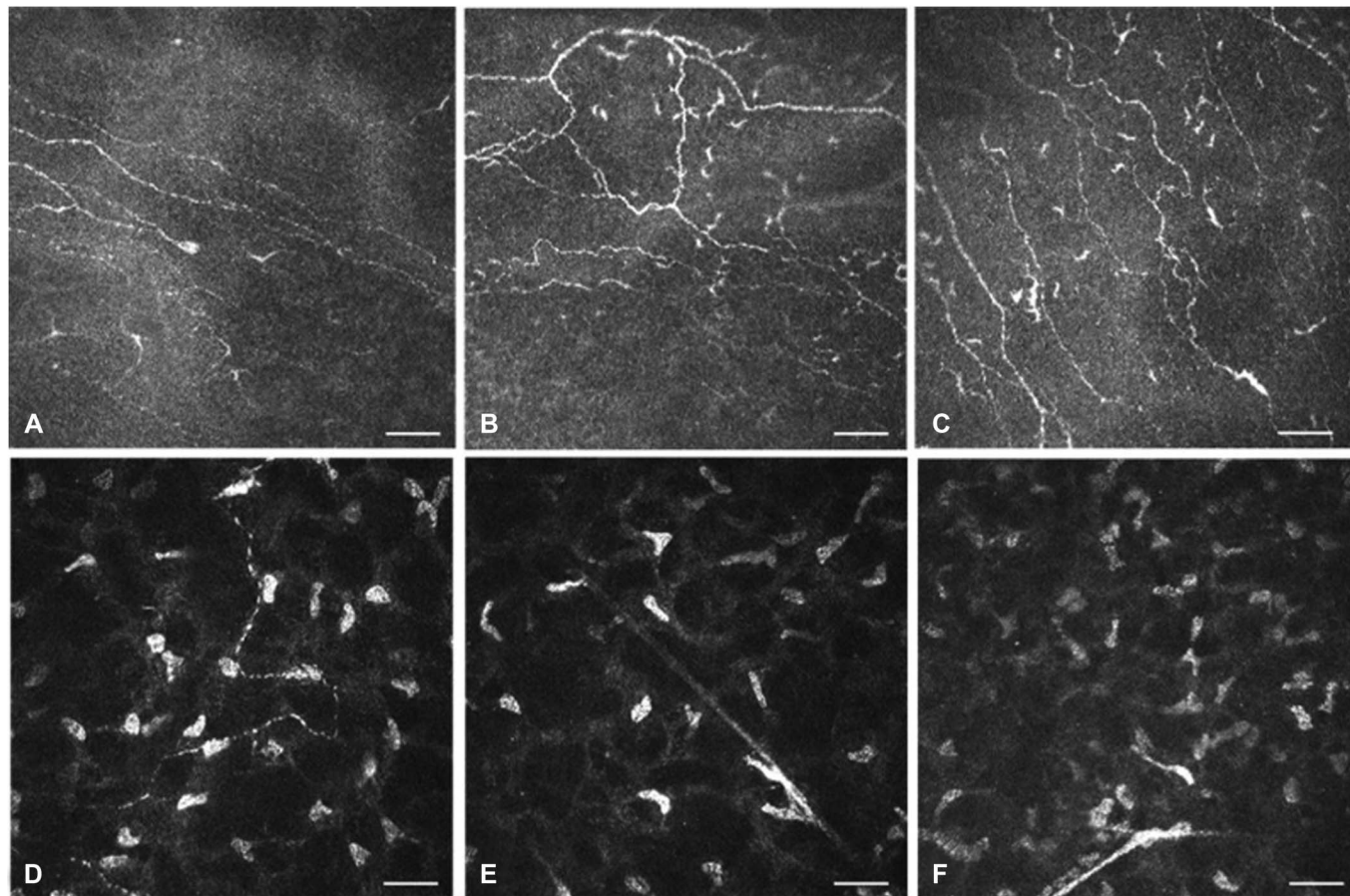


FIGURE 4. Corneal subbasal (A–C) and stromal nerve fiber (D and E) changes after SARS-CoV-2 infection. Decreased nerve density (A), tortuosity (B and C) with fusiform microneuroma (C), nerve beading (D), and lateral microneuroma (E and F). The scale bar represents 50 μm .

are widely distributed in surface barrier tissues, including mucosal membranes and the cornea.^{19,20} After antigen take-up and processing, DCs undergo maturation and migrate from the sites of antigen acquisition to lymphoid organs and stimulate T lymphocytes to initiate adaptive immune response.¹⁹

Previous authors demonstrated that IVCM showed excellent correlation with immunohistochemistry in determining the density and maturity of DCs in the human cornea.^{20,21} In our study, a significantly higher DC density was found in patients after mild COVID-19 infection when compared with healthy volunteers. We also observed a significantly greater DC area after SARS-CoV-2 infection. Recent studies have shown that the DC density significantly increases in various conditions such as dry eye disease,^{12,22–26} corneal graft rejection,²⁷ graft-versus-host disease,²⁸ infectious keratitis,²⁹ and systemic autoimmune diseases.^{22,25,26} A meta-analysis showed that mean DC density was 26.4 ± 13.6 cells/ mm^2 (95% confidence interval: 22.5–26.8) at the central cornea of healthy subjects.⁵ In patients after SARS-CoV-2 infection, we observed 3 times as high DC density. In immune-mediated ocular surface disease (graft-versus-host disease), the central DC density was 119.29 ± 79.78 cells/

mm^2 because of immune activation and inflammation on the ocular surface.²⁸ Previous studies reported that branched DCs are more likely immunologically mature, and round cells without dendrites may be immunologically immature DCs.³⁰ We were able to identify both mature DCs and immature round cells without dendrites after SARS-CoV-2 infection. The presence of high amount of DCs in the central cornea was found to be of differential diagnostic importance in herpetic anterior uveitis.³⁰

Besides evaluating central corneal DC density and morphology, corneal subbasal nerve fiber degeneration was also studied after SARS-CoV-2 infection. IVCM demonstrated clinically and statistically significant nerve fiber loss and morphology changes after COVID-19. Tepelus et al³¹ observed the reduced density of corneal nerves and greater proportions of inflammatory DCs in patients with dry eye disease implying a possible synergy between the immune and peripheral nerve systems in the cornea, which has previously been demonstrated in different etiologies of infectious keratitis.³²

Recently, Bitirgen et al³³ examined corneal DC density and nerve fiber morphology in patients after different severity of COVID-19. They described increased corneal DC density

and nerve fiber loss in patients with and without long COVID-19.³³ The difference was more pronounced in post-COVID-19 patients with neurological symptoms at 4 weeks.³³ Our results confirm their findings even in the absence of severe COVID-19 symptoms.

In patients after SARS-CoV-2 infection, we identified microneuromas in the subbasal nerve plexus and stromal nerves. Microneuromas could be the consequences of nerve damage and signs of nerve regeneration.³⁴ After injury, sprouts will grow from the proximal nerve stump advancing distally. Some sprouting axons may grow extraneurally forming neuromas.³⁴ Ross et al¹³ described 3 types of corneal microneuromas: stump, lateral, and spindle (fusiform) neuromas. The formation of peripheral nerve neuromas involves neuroinflammatory processes; thus, suppression of neuroinflammation may prevent formation of neuromas.³⁵ In the human cornea, subbasal and stromal microneuromas have been reported in various conditions, such as neuropathic corneal pain,^{13,36} bullous keratopathy,³⁷ and in postkeratoplasty eyes.³⁸ Corneal microneuromas after COVID-19 could be attributed to inflammatory and immune-mediated processes that could cause nerve damage.¹³ Although neuromas of peripheral nerves are often painful,³⁵ none of our patients after COVID-19 reported corneal pain. Other nerve fiber morphologic alterations after SARS-CoV-2 infection included increased tortuosity, discontinuity, and beading. In patients with inflammatory ocular surface diseases, increased tortuosity of subbasal nerve fibers is believed to result from regeneration processes.²⁸ Nerve beading has been reported in neuropathic corneal pain but also in healthy individuals and was believed to reflect higher metabolic activity.^{36,39}

The basal epithelial, anterior stromal keratocyte, and endothelial cell density of the cornea did not show any significant changes after SARS-CoV-2 infection. We observed a reduction in posterior keratocyte density after COVID-19. Lower posterior keratocyte density was shown to be associated with corneal nerve loss in adults with diabetes mellitus.⁴⁰ In patients after SARS-CoV-2 infection, an inverse correlation was found between anterior keratocyte density and nerve fiber area. A statistically significant association was obtained between DC density and nerve fiber total branch density after COVID-19.

There are a few limitations to this study. There was a limited sample size, and patients were only enrolled after mild SARS-CoV-2 infection. Second, electrodiagnostic tests or skin biopsy was not obtained to confirm the diagnosis of peripheral neuropathy and to reveal its clinical pattern. Third, standard dry eye disease evaluation with tear film osmolarity measurement and corneal esthesiometry was not performed in any subject groups. The relevance of our study is that we demonstrated peripheral small nerve fiber damage associated with inflammatory DC cells even in the absence of severe COVID-19. Further studies are needed to investigate the long-term complications of COVID-19-associated corneal neuropathy and its regenerative capacity.

The most conspicuous finding of this study was that the proportion of mature DCs in the central cornea more than tripled after SARS-CoV-2 infection compared with healthy volunteers. A significant loss and altered morphology of

subbasal nerve fibers were also seen after COVID-19 indicating nerve damage and regeneration. Corneal cellular and ultrastructural changes demonstrated in this study implied neuroinflammatory consequences of COVID-19 in the cornea in the absence of ophthalmoscopic alterations.

REFERENCES

- Güemes-Villahoz N, Burgos-Blasco B, Vidal-Villegas B, et al. Novel insights into the transmission of SARS-CoV-2 through the ocular surface and its detection in tears and conjunctival secretions: a review. *Adv Ther.* 2020;37:4086–4095.
- Meduri A, Oliverio GW, Mancuso G, et al. Ocular surface manifestation of COVID-19 and tear film analysis. *Sci Rep.* 2020;10:20178.
- Ozturker ZK. Conjunctivitis as sole symptom of COVID-19: a case report and review of literature. *Eur J Ophthalmol.* 2021;31:NP161–NP166.
- Hamrah P, Huq SO, Liu Y, et al. Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.* 2003;74:172–178.
- Mobeen R, Stapleton F, Chao C, et al. Corneal epithelial dendritic cell density in the healthy human cornea: a meta-analysis of in-vivo confocal microscopy data. *Ocul Surf.* 2019;17:753–762.
- Schimmelpennig B. Nerve structures in human central corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1982;218:14–20.
- Bitirgen G, Ozkagnici A, Malik RA, et al. Corneal nerve fibre damage precedes diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2014;31:431–438.
- Dehghani C, Pritchard N, Edwards K, et al. Abnormal anterior corneal morphology in diabetes observed using in vivo laser-scanning confocal microscopy. *Ocul Surf.* 2016;14:507–514.
- Szalai E, Deák E, Módos L, et al. Early corneal cellular and nerve fiber pathology in young patients with type 1 diabetes mellitus identified using corneal confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:853–858.
- Erie JC, Patel SV, McLaren JW, et al. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol.* 2002;134:689–695.
- Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, et al. Laser scanning in vivo confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:2964–2970.
- Kheirkhah A, Rahimi Darabad R, Cruzat A, et al. Corneal epithelial immune dendritic cell alterations in subtypes of dry eye disease: a pilot in vivo confocal microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:7179–7185.
- Ross AR, Al-Aqaba MA, Almaazmi A, et al. Clinical and in vivo confocal microscopic features of neuropathic corneal pain. *Br J Ophthalmol.* 2019;104:768–775.
- Choudhary R, Kapoor MS, Singh A, et al. Therapeutic targets of renin-angiotensin system in ocular disorders. *J Curr Ophthalmol.* 2017;29:7–16.
- Sungnak W, Huang N, Bécavin C, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med.* 2020;26:681–687.
- Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003;426:450–454.
- Ni W, Yang X, Yang D, et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care.* 2020;24:422.
- Kovacs A, Ipsen A, Manzel A, et al. ACE2 drives dendritic cell function and neuroantigen specific immune responses. *Brain Behav Immun.* 2013;29:S19.
- Borges RC, Hohmann MS, Borghi SM. Dendritic cells in COVID-19 immunopathogenesis: insights for a possible role in determining disease outcome. *Int Rev Immunol.* 2020;40:108–125.
- Lagali NS, Badian RA, Liu X, et al. Dendritic cell maturation in the corneal epithelium with onset of type 2 diabetes is associated with tumor necrosis factor receptor superfamily member 9. *Sci Rep.* 2018;8:14248.
- Mayer WJ, MacKert MJ, Kranebitter N, et al. Distribution of antigen presenting cells in the human cornea: correlation of in vivo confocal

- microscopy and immunohistochemistry in different pathologic entities. *Curr Eye Res.* 2012;37:1012–1018.
22. Tuisku IS, Konttinen YT, Konttinen LM, et al. Alterations in corneal sensitivity and nerve morphology in patients with primary Sjögren's syndrome. *Exp Eye Res.* 2008;86:879–885.
 23. Lin H, Li W, Dong N, et al. Changes in corneal epithelial layer inflammatory cells in aqueous tear-deficient dry eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:122–128.
 24. Villani E, Magnani F, Viola F, et al. In vivo confocal evaluation of the ocular surface morpho-functional unit in dry eye. *Optom Vis Sci.* 2013;90:576–586.
 25. Marsovszky L, Németh J, Resch MD, et al. Corneal Langerhans cell and dry eye examinations in ankylosing spondylitis. *Innate Immun.* 2014;20:471–477.
 26. Marsovszky L, Resch MD, Németh J, et al. In vivo confocal microscopic evaluation of corneal Langerhans cell density, and distribution and evaluation of dry eye in rheumatoid arthritis. *Innate Immun.* 2012;19:348–354.
 27. Niederer RL, Sherwin T, McGhee CNJ. In vivo confocal microscopy of subepithelial infiltrates in human corneal transplant rejection. *Cornea.* 2007;26:501–504.
 28. He J, Ogawa Y, Mukai S, et al. In vivo confocal microscopy evaluation of ocular surface with graft-versus-host disease-related dry eye disease. *Sci Rep.* 2017;7:10720.
 29. Mocan MC, Irkeç M, Mikropoulos DG, et al. In vivo confocal microscopic evaluation of the inflammatory response in non-epithelial herpes simplex keratitis. *Curr Eye Res.* 2012;37:1099–1106.
 30. Postole AS, Knoll AB, Auffarth GU, et al. In vivo confocal microscopy of inflammatory cells in the corneal subbasal nerve plexus in patients with different subtypes of anterior uveitis. *Br J Ophthalmol.* 2016;100:1551–1556.
 31. Tepelus TC, Chiu GB, Huang J, et al. Correlation between corneal innervation and inflammation evaluated with confocal microscopy and symptomatology in patients with dry eye syndromes: a preliminary study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2017;255:1771–1778.
 32. Cruzat A, Witkin D, Baniyadi N, et al. Inflammation and the nervous system: the connection in the cornea in patients with infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:5136–5143.
 33. Bitirgen G, Korkmaz C, Zamani A, et al. Corneal confocal microscopy identifies corneal nerve fibre loss and increased dendritic cells in patients with long COVID. *Br J Ophthalmol.* 2021;2021:1–7.
 34. Lundborg G. Nerve regeneration and repair: a review. *Acta Orthop.* 1987;58:145–169.
 35. Minarelli J, Davis EL, Dickerson A, et al. Characterization of neuromas in peripheral nerves and their effects on heterotopic bone formation. *Mol Pain.* 2019;15:1–12.
 36. Moein HR, Akhlaq A, Dieckmann G, et al. Visualization of micro-neuromas by using in vivo confocal microscopy: an objective biomarker for the diagnosis of neuropathic corneal pain? *Ocul Surf.* 2020;18:651–656.
 37. Al-Aqaba M, Alomar T, Lowe J, et al. Corneal nerve aberrations in bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol.* 2011;151:840–849.
 38. Al-Aqaba MA, Otri AM, Fares U, et al. Organization of the regenerated nerves in human corneal grafts. *Am J Ophthalmol.* 2012;153:29–37.
 39. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, et al. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res.* 2003;76:521–542.
 40. Kalteniece A, Ferdousi M, Azmi S, et al. Keratocyte density is reduced and related to corneal nerve damage in diabetic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:3584–3590.

Pre-Ophthalmoscopic Quantitative Biomarkers in Diabetes Mellitus

Zsofia Kolkedi¹, Adrienne Csutak¹, and Eszter Szalai¹

¹ Department of Ophthalmology, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary

Correspondence: Eszter Szalai, Department of Ophthalmology, University of Pécs Medical School, Rákóczi u. 2, 7623 Pécs, Hungary. e-mail: szalai.eszter@pte.hu

Received: December 29, 2022

Accepted: February 20, 2023

Published: March 27, 2023

Keywords: optical coherence tomography (OCT) angiography; confocal microscopy; neuropathy; diabetes mellitus (DM)

Citation: Kolkedi Z, Csutak A, Szalai E. Pre-ophthalmoscopic quantitative biomarkers in diabetes mellitus. *Transl Vis Sci Technol.* 2023;12(3):24, <https://doi.org/10.1167/tvst.12.3.24>

Purpose: The purpose of this study was to assess whether retinal microvascular or corneal nerve abnormalities occur earlier in diabetes mellitus (DM) and to identify imaging biomarkers in order to help prevent the subsequent irreversible retinal and corneal complications.

Methods: The study comprised 35 eyes of 35 healthy volunteers and 52 eyes of 52 patients with type 1 and type 2 DM. Swept-source optical coherence tomography (OCT), OCT angiography, and in vivo corneal confocal microscopy were performed in both groups. Corneal sub-basal nerve plexus and vessel density (VD) of superficial capillary plexus (SCP) and deep capillary plexus (DCP) were evaluated.

Results: All corneal sub-basal nerve fiber parameters were decreased in patients with DM compared with healthy subjects and the difference was significant for each result except for nerve fiber width ($P = 0.586$). No significant correlation was obtained between any nerve fiber morphology parameters and disease duration or HbA1C. VD in SCP was significantly decreased in the superior ($P < 0.0001$), temporal ($P = 0.001$), and nasal quadrant ($P = 0.003$) in the diabetes group. In DCP, only superior VD ($P = 0.036$), decreased significantly in the diabetes group. Ganglion cell layer thickness in the inner ring showed a significantly lower value in patients with DM ($P < 0.0001$).

Conclusions: Our results implicate a more pronounced and earlier damage to the corneal nerve fibers compared to the retinal microvasculature in patients with DM.

Translational Relevance: In DM, an earlier and more pronounced damage to the corneal nerve fibers was observed compared to the retinal microvasculature.

Introduction

Small fiber polyneuropathy and retinopathy are long-term microvascular complications of diabetes mellitus (DM). The worldwide diabetic retinopathy (DR) population has been estimated to increase by 55.6% from 2020 to 2045.¹ This can be attributed to the rapidly expanding diabetic population. The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) presented that up to 40% of patients with type 2 diabetes (T2DM) have some degree of DR at the time of diagnosis; however, in case of type 1 diabetes (T1DM), DR is considered as a later and more acute complication.² Peripheral neuropathy can be detected both in T1DM, T2DM, as well as in prediabetic states (impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose) and

metabolic syndrome.^{3,4} The UKPDS investigation and more recent population-based studies have shown that strict glucose control and improved cardiovascular status may reduce the risk of the DM-related tissue complications, including retinopathy and neuropathy, and allow for prevention of further morbidity and mortality.^{5,6}

Regular ophthalmic screening is recommended for patients with DM to monitor DR and other ocular complications. However, imaging technologies have been evolving rapidly that may assist or possibly replace the standard ophthalmoscopic examination. Recently, ophthalmologists are able to qualify and quantify the retinal capillary network and choriocapillaries, optic nerve head, and corneal peripheral nerves. In vivo confocal microscopy (IVCM) has been shown to reveal early corneal sub-basal nerve fiber changes in

patients with diabetes before any apparent fundoscopic alterations.^{7,8} Optical coherence tomography angiography (OCTA) provides a direct, noninvasive visualization and quantification of the retinal microvasculature and blood flow.⁹

A biomarker is a feature that can be evaluated objectively and is of importance in diagnosis, grading, and prognosis of a particular disease.¹⁰ A quantitative imaging biomarker can be defined as an objective indicator of a pathogenic process.¹¹ Our aim was to assess whether retinal microvascular or corneal nerve abnormalities occur earlier in DM and to identify imaging biomarkers in order to help prevent the subsequent irreversible retinal and corneal complications.

Patients and Methods

This cross-sectional study comprised 35 eyes of 35 healthy volunteers and 52 eyes of 52 patients with T1DM (10 patients) and T2DM (42 patients). A complete ophthalmic examination was carried out on every study subject, including visual acuity, intraocular pressure, slit-lamp examination with dilated fundus examination, corneal tomography (Anterior; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany), IVCN (Heidelberg Retina Tomograph II Rostock Cornea Module; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany), posterior segment optical coherence tomography (OCT) and OCTA (Topcon DRI OCT Triton Swept source OCT, Topcon, Japan). Healthy subjects had a negative history of ocular surgery, trauma, and present or prior ophthalmic disease other than refractive errors (less than ± 3.0 D spherical and cylindrical power). Dilated fundus investigation was performed in all study patients. The International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale¹² was used to classify the stage of DR: 0 = no retinopathy, 1 = mild nonproliferative DR, 2 = moderate nonproliferative DR, 3 = severe nonproliferative DR, and 4 = proliferative DR. The study was performed in accordance with the tenets of the Helsinki Declaration and the protocol was approved by the University of Pecs Institutional Ethical Review Board (Number: 8433 – PTE 2020.). Written informed consent was obtained from all study subjects.

All study subjects underwent IVCN of all corneal layers, as described previously.^{8,13} In both study groups, one eye was selected randomly for further analysis. Three good quality images of the sub-basal nerve plexus were selected in three different areas of the central cornea and they were analyzed with ACCMetrics software version 3 (University of Manchester, Manchester, UK).^{14–18} Corneal nerve fiber density

(NFD), the number of nerve fibers/mm²; nerve branch density (NBD), the number of primary branch points on the main nerve fibers/mm²; nerve fiber length (NFL), the total length of nerves mm/mm²; nerve fiber total branch density (TBD), the total number of branch points/mm²; nerve fiber area (NFA), the total nerve fiber area mm²/mm²; and nerve fiber width (NFW), the average nerve fiber width mm/mm², and fractal dimension (FD) were evaluated.

OCTA imaging was performed with 3 mm \times 3 mm volumetric scans centered at the fovea. Automated layer segmentation was obtained for superficial capillary plexus (SCP) and deep capillary plexus (DCP) using the instrument-based software (IMAGEnet 6 version 1.26.16898; Topcon), as described previously.¹⁹ The vessel density (VD) was measured in four quadrants by IMAGEnet software. Foveal avascular zone (FAZ) was manually outlined by the same trained examiner (author Z.K.) using the built-in software. Structural OCT was performed with SMARTTrack HD Raster centered at the macula (6.0 \times 6.0 mm) and 3D Disc program (6.0 \times 6.0 mm) centered at the optic nerve head. Retinal nerve fiber layer thickness (RNFL) between inner limiting membrane (ILM)-RNFL/ganglion cell layer (GCL) boundaries centered on the optic disc and central choroidal thickness between Bruch's membrane and choroid-sclera interface centered at the macula were evaluated by using the instrument-generated thickness maps. For ganglion cell complex thickness measurement, two values were recorded centered at the macula: GCL+ between RNFL/GCL-inner plexiform layer (IPL)/inner nuclear layer (INL) boundaries and GCL++ between ILM-IPL/INL boundaries. Central retinal thickness was also measured between the ILM-outer segment/retinal pigment epithelium boundaries in the macula. All IVCN and OCT examinations were acquired by an experienced examiner (ZK). The image selection and analysis for the IVCN and OCTA were carefully reviewed by two independent examiners (authors Z.K. and E.S.). Low-quality IVCN and OCTA images or presence of any motion artifacts were excluded from the analysis.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the SPSS Statistics 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY), MedCalc version 14.8.1 (MedCalc Software, Ostend, Belgium), and Prism 9.4.1 for macOS (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For each data set, mean, standard deviation (SD) and 95% confidence interval (95% CI) for the mean were calculated. Mann-Whitney *U* test was

carried out for comparison between the two groups or variables. For bivariate correlation analysis, the Spearman's rank correlation "r" was used. A *P* value below 0.05 was considered statistically significant.

Results

The mean age of the healthy volunteers and patients with DM was 49.88 ± 17.01 years (ranging from 20 to 73 years) and 56.04 ± 13.66 years (ranging from 22 to 78 years), respectively ($P = 0.155$). In the diabetes group, the mean disease duration was 11.17 ± 11.73 years (ranging from 1 month to 52 years). The mean HbA1c was $7.28\% \pm 1.33\%$ (ranging from 5.5% to 13%). The mean body mass index for patients with DM was 31.01 ± 6.28 (ranging from 21.26 to 47.45). T1DM was diagnosed in 10 patients and T2DM was found in 42 patients. No subjects had moderate to severe nonproliferative or proliferative DR.

The ocular biometry data of all subjects are summarized in Table 1. No statistically significant difference was found in any of the biometry results between the two groups except for the central corneal thickness ($P = 0.016$) and lens thickness ($P = 0.018$).

All corneal subbasal nerve fiber parameters were decreased in patients with DM compared to healthy subjects (Figs. 1, 2, Table 2) and the difference was significant for each result except for NFW ($P = 0.586$).

No statistically significant correlation was obtained between any nerve fiber morphology parameters and disease duration or HbA1C.

No significant difference was observed in central retinal thickness between the control and diabetes groups ($P = 0.089$; Table 3). Central choroidal thickness was lower in patients with DM ($P = 0.016$). The vessel density in SCP was significantly decreased in the superior ($P < 0.0001$), temporal ($P = 0.001$), and nasal quadrant ($P = 0.003$) in the diabetes group (Figs. 2, 3). In DCP, only superior VD ($P = 0.036$), decreased significantly in the diabetes group (see Fig. 3). GCL in the inner ring showed a significantly lower value in patients with DM ($P < 0.0001$). There was an enlargement in the FAZ area measured in SCP in the diabetes group but the difference was only borderline compared to the healthy group ($P = 0.051$). Significant inverse correlation was observed between disease duration and vessel density of SCP in superior ($r = -0.539$, $P < 0.0001$), temporal ($r = -0.557$, $P < 0.0001$), inferior ($r = -0.433$, $P = 0.005$), and nasal quadrant ($r = -0.372$, $P = 0.015$) and between disease duration and vessel density of DCP in the inferior ($r = -0.369$, $P = 0.019$) and nasal quadrants ($r = -0.458$, $P = 0.003$). HbA1C did not show significant correlation with any of the OCTA parameters. No significant correlation was observed between any of the sub-basal nerve fiber morphology and retinal microvasculature parameters in the study groups.

Table 1. Ocular Biometry in Healthy Volunteers Compared to Patients With Diabetes Mellitus

	Healthy Volunteers ^a	Patients With Diabetes Mellitus ^a	<i>P</i> Value ^b
Anterior K1 (D)	43.436 ± 1.593 (42.872 – 44.001)	43.258 ± 1.391 (42.773 – 43.743)	0.341
Anterior K2 (D)	44.157 ± 1.720 (43.547 – 44.767)	44.011 ± 1.469 (43.499 – 44.524)	0.319
Astigmatism (D)	0.912 ± 0.628 (0.693 – 1.131)	0.735 ± 0.372 (0.603 – 0.867)	0.454
CCT (μm)	545.625 ± 50.365 (527.466 – 563.784)	563.618 ± 42.546 (548.773 – 578.462)	0.016
Internal ACD (mm)	2.757 ± 0.555 (2.560 – 2.953)	2.83 ± 0.564 (2.627 – 3.034)	0.267
WTW (mm)	11.858 ± 0.406 (11.712 – 12.004)	11.763 ± 0.395 (11.625 – 11.901)	0.379
LT (mm)	4.262 ± 0.363 (4.134 – 4.391)	4.506 ± 0.388 (4.355 – 4.656)	0.018
AL (mm)	23.373 ± 1.113 (22.978 – 23.767)	23.197 ± 0.918 (22.871 – 23.522)	0.677

K, keratometry; CCT, central corneal thickness; ACD, anterior chamber depth; WTW, white-to-white; LT, lens thickness; AL, axial length.

^aMean \pm standard deviation (95% confidence interval).

^bMann-Whitney *U* test.

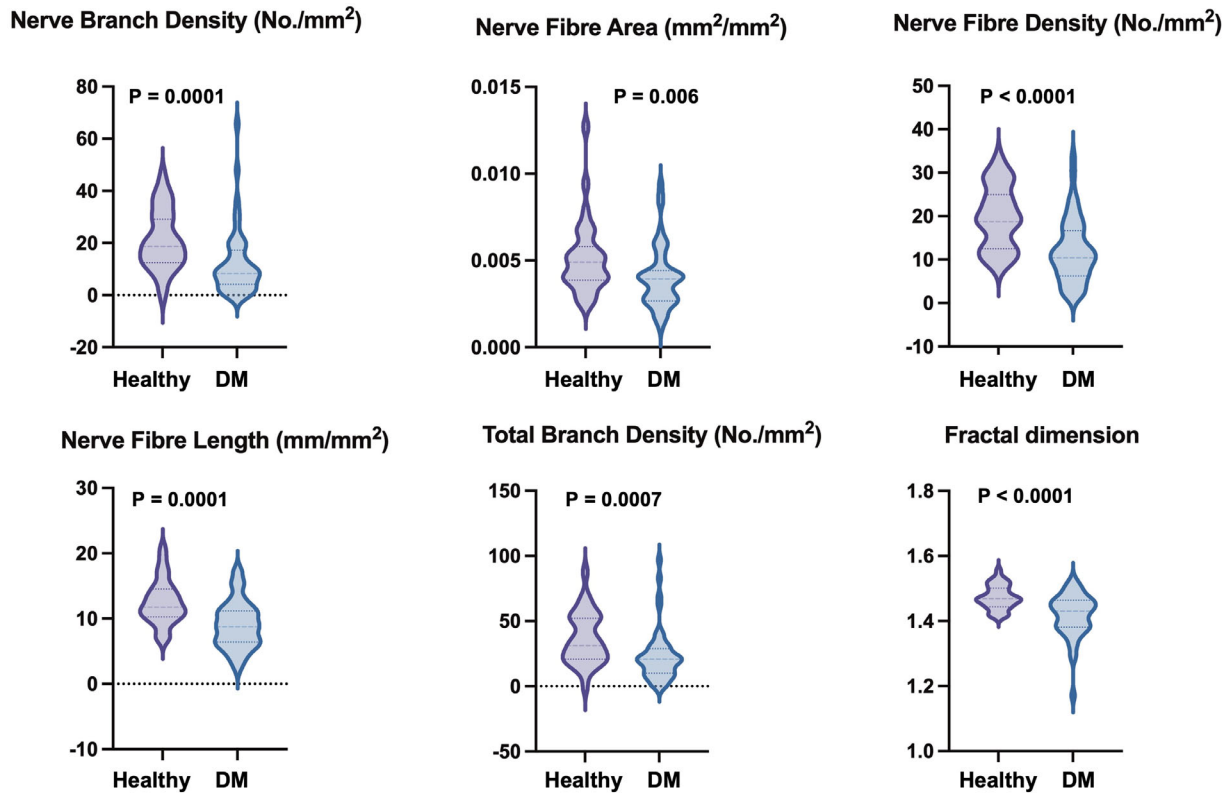


Figure 1. Violin plots of the median and quartiles showing frequency distribution of the sub-basal nerve fiber morphology data in healthy subjects and patients with diabetes mellitus (DM).

Discussion

In this study, we examined patients with diabetes with no to mild ophthalmoscopic alterations using IVCN and OCTA to assess whether retinal microvascular or corneal nerve abnormalities occur earlier in DM. Altered sub-basal nerve fiber morphology was found in patients with DM even in the lack of DR. Previous studies found NFL as the best parameter for diagnosing diabetic peripheral neuropathy followed by NFD.^{7,20} Brines et al. considered NFL and NFA to be more sensitive indicators of mild neuropathy.²¹ Fractal dimension is a relatively new parameter to evaluate corneal nerve morphology by quantifying the spatial loss of nerve fibers. FD was also proposed to have the ability to differentiate between distinct neuropathy etiologies.²² A multinational study suggested that IVCN had a potent predictive diagnostic ability to identify patients with diabetes with greater risk for further diabetic polyneuropathy.²³ In our previous study in young patients with T1DM, we observed lower TBD, confirming early more distal loss of nerve branches, consistent with this loss of thinner more distal branches. Total NFA was comparable between

control subjects and patients with diabetes, presumably due to the early relative preservation of main nerve fibers with a primary reduction in nerve branches.⁸ In the present study, NFW did not differ significantly between diabetic and healthy subjects supporting our previous explanation on early more pronounced loss of distal nerve branches.

In our study, retinal vessel density in SCP was significantly decreased in the superior, temporal, and nasal quadrant in patients with diabetes. In DCP, only superior vascular density decreased significantly in patients with DM. Ong et al. observed lower VD in SCP with higher DR severity in the no retinopathy to mild nonproliferative DR groups and concluded that SCP VD changes may be more sensitive for discriminating nonproliferative DR.²⁴ Previous authors also demonstrated that in patients with a long history of T2DM without DR, a decrease in VD and perfusion and impairment of the FAZ border occur earlier in the superficial vascular plexus than in the deep vascular plexus.²⁵ In contrast, Kaoual et al. described retinal vascular alterations in patients with no to early retinopathy primarily in DCP suggesting that the deeper vascular plexus is more vulnerable to DM severity vascular changes.²⁶ In contrast to our findings,

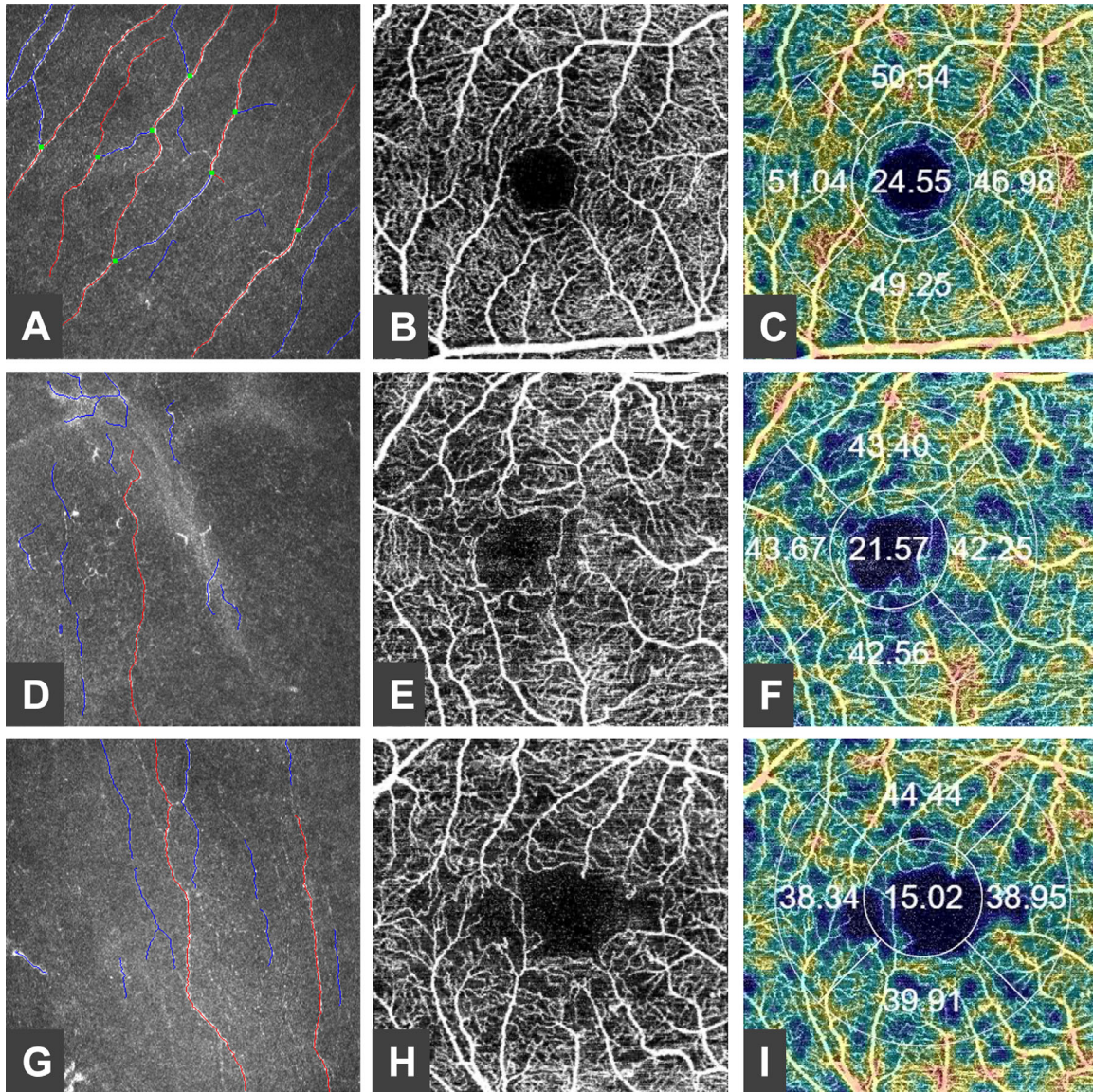


Figure 2. Annotated image of the subbasal nerve plexus using in vivo confocal microscopy (*red*, nerve fiber; *blue*, nerve branch; and *green*, nerve branch point) (**A**, **D**, **G**). Optical coherence tomography angiography (OCTA) centered at the fovea showing the foveal avascular zone (FAZ) (**B**, **E**, **H**). Vessel density (VD) map in the superficial capillary plexus in four quadrants (**C**, **F**, **I**). Normal nerve fiber morphology (**A**), OCTA (**B**), and VD map (**C**) of a healthy volunteer. Altered nerve fiber morphology (**D**), impaired FAZ circularity (**E**), and decreased VD (**F**) of a 44-year-old patient with type 1 diabetes mellitus for 40 years without retinopathy (HbA1c, 7.67%). Sub-basal nerve fiber damage (**G**), enlarged FAZ (**H**), and decreased VD (**I**) in a 49-year-old patient with type 2 diabetes mellitus for 10 years without retinopathy (HbA1c, 9.11%).

Kirthi et al. observed more prominent retinal microvascular changes in prediabetes compared to corneal nerve fiber damage, although the central corneal NFL showed significantly decreased values in T2DM when compared to normoglycemic subjects.²⁷ They highlight the impact of obesity, waist size, and body mass index (BMI) on corneal nerve loss.²⁷

According to other authors, we detected early retinal microvascular changes with OCTA in the absence of ophthalmoscopic alterations.^{28,29} Ghassemi et al. identified parafoveal VD of SCP as a predict-

ing biomarker for visual impairment in DM.³⁰ Significant FAZ increase in SCP was also observed in our patients with diabetes. The ganglion cell complex thickness was significantly decreased in DM in our study. Accordingly, Qiu et al. described correlations between ganglion cell body loss and retinal vasculature changes with the severity of DR.³¹ Previous papers highlighted the association between neuronal degeneration and microvascular changes in diabetes mellitus.^{31,32} GCL and RNFL thickness changes in early DM have been identified as neuroretinal

Table 2. Corneal Nerve Fiber Morphology of Healthy Volunteers Compared to Patients With Diabetes Mellitus

	Healthy Subjects ^a	Patients With Diabetes Mellitus ^a	P Value ^b
Nerve branch density (No/mm ²)	21.252 ± 11.414 (17.065 – 25.439)	12.095 ± 12.663 (8.496 – 15.694)	0.0001
Nerve fiber area (mm ² /mm ²)	0.005 ± 0.002 (0.004 – 0.006)	0.004 ± 0.002 (0.004 – 0.005)	0.006
Nerve fiber density (No/mm ²)	19.723 ± 7.216 (17.076 – 22.370)	12.016 ± 7.192 (9.972 – 14.060)	<0.0001
Nerve fiber length (mm/mm ²)	12.489 ± 3.389 (11.245 – 13.732)	9.041 ± 3.584 (8.022 – 10.059)	0.0001
Nerve fiber width (mm/mm ²)	0.022 ± 0.002 (0.021 – 0.022)	0.021 ± 0.002 (0.021 – 0.022)	0.586
Nerve fiber total branch density (No/mm ²)	36.49 ± 19.740 (29.249 – 43.730)	22.965 ± 19.625 (17.388 – 28.542)	0.0007
Nerve fiber fractal dimension	1.473 ± 0.036 (1.460 – 1.486)	1.418 ± 0.066 (1.399 – 1.437)	<0.0001

^aMean ± standard deviation (95% confidence interval).

^bMann-Whitney *U* test.

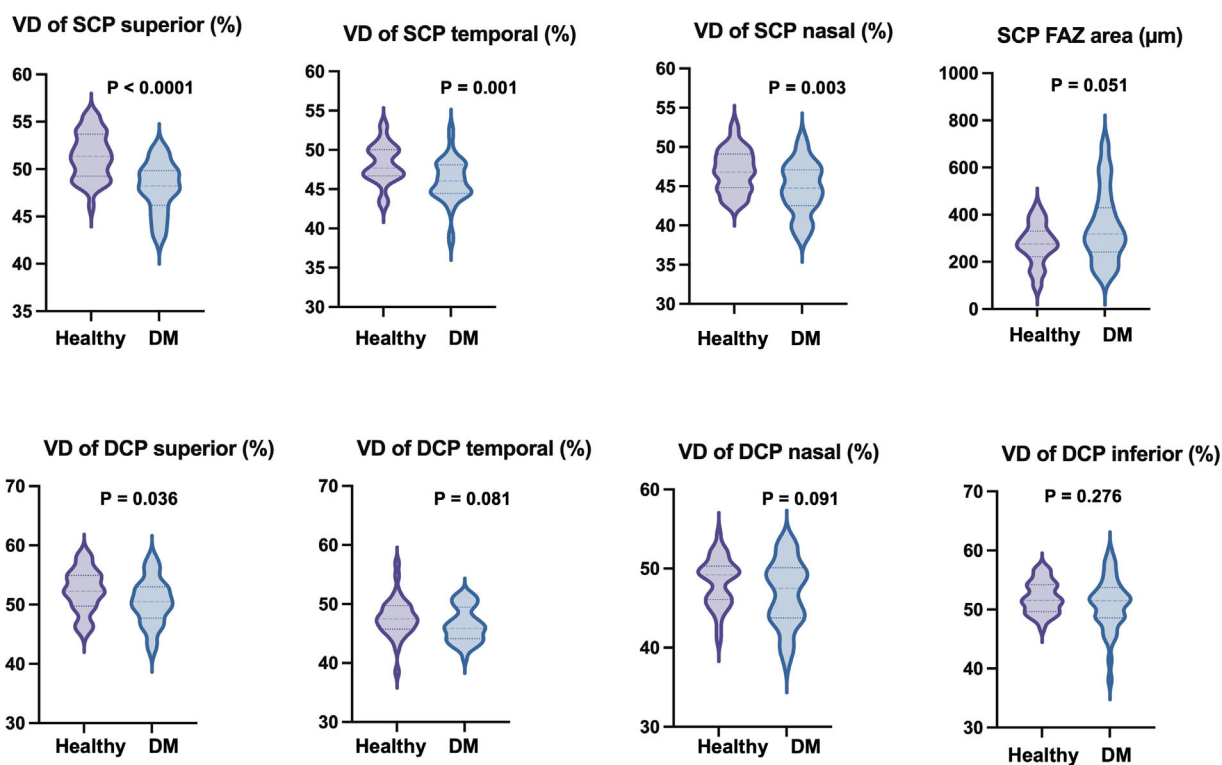


Figure 3. Violin plots of the median and quartiles showing frequency distribution of the vessel density (VD) data in the superficial (SCP) and deep capillary plexus (DCP) and foveal avascular zone (FAZ) area in healthy subjects and patients with diabetes mellitus (DM).

degeneration that may anticipate microvascular alterations.³² In a recent study, a clear interaction was observed between age or age at diagnosis and diabetes duration and the risk of microvascular events. They found the greatest risks of microvascu-

lar events in the youngest ages with the longest disease duration.³³

There are a few limitations to this study. First, this was a simultaneous measurement of exposure (DM) and outcome, it is difficult to derive causal or temporal

Table 3. Optical Coherence Tomography (OCT) and OCT Angiography Parameters in Healthy Volunteers Compared to Patients With Diabetes Mellitus

	Healthy Subjects ^a	Patients With Diabetes Mellitus ^a	P Value ^b
Central retinal thickness (μm)	259.029 ± 18.978 (252.408 – 265.651)	251.0 ± 24.491 (244.182 – 257.818)	0.089
Central choroidal thickness (μm)	273.455 ± 72.974 (247.579 – 299.330)	237.708 ± 81.935 (213.917 – 261.500)	0.016
VD of SCP CSF (%)	21.649 ± 5.442 (19.780 – 23.519)	19.88 ± 5.219 (18.274 – 21.486)	0.116
VD of SCP superior (%)	51.377 ± 2.449 (50.535 – 52.218)	48.063 ± 2.645 (47.239 – 48.887)	<0.0001
VD of SCP temporal (%)	48.207 ± 2.456 (47.364 – 49.051)	46.069 ± 2.786 (45.212 – 46.927)	0.001
VD of SCP inferior (%)	50.990 ± 3.067 (49.920 – 52.061)	49.147 ± 3.910 (47.929 – 50.366)	0.138
VD of SCP nasal (%)	46.937 ± 2.689 (46.013 – 47.861)	44.691 ± 3.307 (43.674 – 45.709)	0.003
SCP FAZ area (μm)	274.722 ± 86.541 (244.036 – 305.408)	348.511 ± 151.528 (301.292 – 395.731)	0.051
VD of DCP CSF (%)	19.317 ± 4.632 (17.647 – 20.988)	17.843 ± 5.460 (16.142 – 19.545)	0.236
VD of DCP superior (%)	52.359 ± 3.596 (51.124 – 53.594)	50.483 ± 3.890 (49.255 – 51.710)	0.036
VD of DCP temporal (%)	47.673 ± 3.302 (46.539 – 48.808)	46.485 ± 2.943 (45.568 – 47.402)	0.081
VD of DCP inferior (%)	52.072 ± 2.684 (51.150 – 52.994)	50.924 ± 4.420 (49.529 – 52.319)	0.276
VD of DCP nasal (%)	48.345 ± 3.054 (47.296 – 49.394)	46.855 ± 4.166 (45.557 – 48.154)	0.091
GCL ++ CSF (μm)	60.379 ± 11.723 (56.291 – 64.472)	64.901 ± 22.679 (58.310 – 71.475)	0.598
GCL ++ inner ring (μm)	116.904 ± 7.699 (114.218 – 119.591)	109.224 ± 9.628 (106.428 – 112.020)	<0.0001
GCL ++ outer ring (μm)	108.794 ± 6.920 (106.380 – 111.208)	104.972 ± 10.129 (102.031 – 107.913)	0.037
GCL+ CSF (μm)	53.235 ± 9.433 (49.944 – 56.526)	55.042 ± 15.612 (50.509 – 59.575)	0.595
GCL + inner ring (μm)	90.941 ± 6.326 (88.734 – 93.148)	83.76 ± 8.009 (81.435 – 86.086)	<0.0001
GCL + outer ring (μm)	67.36 ± 6.803 (64.987 – 69.734)	64.86 ± 5.894 (63.129 – 66.590)	0.152
RNFL total thickness (μm)	106.667 ± 12.504 (102.233 – 111.100)	101.848 ± 10.556 (98.713 – 104.982)	0.060

VD, vessel density; SCP, superficial capillary plexus; DCP, deep capillary plexus; FAZ, foveal avascular zone; GCL, ganglion cell layer; RNFL, retinal nerve fiber layer; CSF, thickness within central 1 mm, inner ring: thickness within central 3 mm, outer ring: thickness within central 6 mm.

^aMean ± standard deviation (95% confidence interval).

^bMann-Whitney *U* test.

relationships from a cross-sectional analysis and it might not be representative of the diabetic population. Second, there was a small sample size of patients with DR, a larger case number with more advanced ophthalmoscopic changes would be required. Third, the ophthalmic imaging was performed at a time point during the disease course, not at baseline, and in patients with diabetes it is difficult to know the exact disease duration. Fourth, snapshots of the sub-basal corneal nerves were selected manually, they only represent a small part of the cornea that might have some subjective elements.

In summary, sub-basal nerve fiber morphology was altered significantly in patients with DM but they did not show a significant correlation with disease duration and HbA1c. Our results implicate a more pronounced and earlier damage to the corneal nerve fibers compared to the retinal microvasculature in patients with DM.

Acknowledgments

Supported by PTE ÁOK-KA-2021-14 and the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

Disclosure: **Z. Kolkedi**, None; **A. Csutak**, None; **E. Szalai**, None

References

1. Teo ZL, Tham YC, Yu M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: Systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2021;128(11):1580–1591.
2. Vithian K, Hurler S. Microvascular complications: Pathophysiology and management. *Clin Med (Northfield Il)*. 2010;10(5):505–509.
3. Zochodne D. Clinical features of diabetic polyneuropathy. *Handb Clin Neurol*. 2014;126:23–30.
4. Roszkowska AM, Licitra C, Tumminello G, Postorino EI, Colonna MR, Aragona P. Corneal nerves in diabetes—The role of the in vivo corneal confocal microscopy of the subbasal nerve plexus in the assessment of peripheral small fiber neuropathy. *Surv Ophthalmol*. 2021;66(3):493–513.
5. Turner R. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998;352(9131):837–853.
6. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2014. *Diabetes Care*. 2014;37(Suppl. 1):14–80.
7. 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.
8. Szalai E, Deák E, Módis L, et al. Early corneal cellular and nerve fiber pathology in young patients with type 1 diabetes mellitus identified using corneal confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(3):853–858.
9. Sun Z, Yang D, Tang Z, Ng DS, Cheung CY. Optical coherence tomography angiography in diabetic retinopathy: An updated review. *Eye*. 2021;35(1):149–161.
10. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95.
11. Prescott JW. Quantitative imaging biomarkers: The application of advanced image processing and analysis to clinical and preclinical decision making. *J Digit Imaging*. 2013;26(1):97–108.
12. Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003;110(9):1677–1682.
13. Kolkedi Z, Csutak A, Szalai E. Corneal cellular and neuroinflammatory changes after SARS-CoV-2 infection. *Cornea*. 2022;41(7):879–885.
14. Dabbah MA, Graham J, Petropoulos IN, Tavakoli M, Malik RA. Automatic analysis of diabetic peripheral neuropathy using multi-scale quantitative morphology of nerve fibres in corneal confocal microscopy imaging. *Med Image Anal*. 2011;15(5):738–747.
15. Dabbah MA, Graham J, Petropoulos I, Tavakoli M, Malik RA. Dual-model automatic detection of nerve-fibres in corneal confocal microscopy images. *Med Image Comput Comput Assist Interv*. 2010;13:300–307.
16. Chen X, Graham J, Dabbah MA, Petropoulos IN, Tavakoli M, Malik RA. An automatic tool for quantification of nerve fibres in corneal confocal microscopy images. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2017;64(4):786–794.
17. Petropoulos IN, Alam U, Fadavi H, et al. Rapid automated diagnosis of diabetic peripheral neuropathy with in vivo corneal confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:2071–2078.

18. Petropoulos IN, Manzoor T, Morgan P, et al. Repeatability of in vivo corneal confocal microscopy to quantify corneal nerve morphology. *Cornea*. 2013;32(5):83–89.
19. Kolkedi Z, Csutak A, Szalai E. Analysis of microvascular and neurodegenerative complications of mild COVID-19. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2022;260(8):2687–2693.
20. Patel DV, McGhee CNJ. Mapping of the normal human corneal sub-basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(12):4485–4488.
21. Brines M, Culver DA, Ferdousi M, et al. Corneal nerve fiber size adds utility to the diagnosis and assessment of therapeutic response in patients with small fiber neuropathy. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–11.
22. Chen X, Graham J, Petropoulos IN, et al. Corneal nerve fractal dimension: A novel corneal nerve metric for the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(2):1113–1118.
23. Perkins BA, Lovblom LE, Lewis EJH, et al. Corneal confocal microscopy predicts the development of diabetic neuropathy: A longitudinal diagnostic multinational consortium study. *Diabetes Care*. 2021;44(9):2107–2114.
24. Ong JX, Kwan CC, Cicinelli M V, Fawzi AA. Superficial capillary perfusion on optical coherence tomography angiography differentiates moderate and severe nonproliferative diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2020;15(10 October):1–16.
25. Choi EY, Park SE, Lee SC, et al. Association between clinical biomarkers and optical coherence tomography angiography parameters in type 2 diabetes mellitus. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2020;61(3):1–8.
26. Kaoual H, Zhioua Braham I, Boukari M, Zhioua R. Evaluation of the effect of the severity of diabetic retinopathy on microvascular abnormalities and vascular density using optical coherence tomography angiography. *Acta Diabetol*. 2021;58(12):1683–1688.
27. Kirthi V, Reed KI, Alattar K, et al. Multimodal testing reveals subclinical neurovascular dysfunction in prediabetes, challenging the diagnostic threshold of diabetes. *Diabet Med*. 2022;40(March 2022):1–12.
28. De Carlo TE, Chin AT, Bonini Filho MA, et al. Detection of microvascular changes in eyes of patients with diabetes but not clinical diabetic retinopathy using optical coherence tomography angiography. *Retina*. 2015;35(11):2364–2370.
29. Ebihara S, Machida S, Hara Y, et al. Relationships between the vascular structure and neural function of the macula in patients with diabetes mellitus. *Jpn J Ophthalmol*. 2021;65(1):77–88.
30. Ghassemi F, Fadakar K, Berijani S, Babeli A, Gholizadeh A, Sabour S. Quantitative assessment of vascular density in diabetic retinopathy subtypes with optical coherence tomography angiography. *BMC Ophthalmol*. 2021;21(1):1–13.
31. Qiu B, Zhao L, Zhang X, et al. Associations between diabetic retinal microvasculopathy and neuronal degeneration assessed by swept-source OCT and OCT angiography. *Front Med*. 2021;8(December):1–14.
32. Mrugacz M, Bryl A, Zorena K. Retinal vascular endothelial cell dysfunction and neuroretinal degeneration in diabetic patients. *J Clin Med*. 2021;10(3):1–18.
33. Zoungas S, Woodward M, Li Q, et al. Impact of age, age at diagnosis and duration of diabetes on the risk of macrovascular and microvascular complications and death in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2014;57(12):2465–2474.