

lek. Jakub STĘPIEŃ

**ZASTOSOWANIE ELEKTRONEUROGRAFII W OCENIE
USZKODZEŃ OBWODOWEGO UKŁADU NERWOWEGO
W OKREŚLONYCH JEDNOSTKACH CHOROBYCH**

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

Promotor: **dr hab. n. med. Kazimierz Tomczykiewicz**

Insula Centrum Badań Klinicznych



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

SŁOWA KLUCZOWE

Elektroneurografia, neuropatia, klasyfikacja, COVID-19, cukrzyca

Electroneurography, neuropathy, new classification, COVID-19, diabetes

Mojej Žonie

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PRACĘ DOKTORSKĄ

1. **Stępień Jakub, Pastuszek Żanna, Distal symmetrical polyneuropathy in diabetes mellitus patients: Proposition of a new scoring system based on electroneurography findings**, Adv. Clin. Exp. Med. 2023 Jul 24. doi: 10.17219/acem/168504. Online ahead of print.

IF: 2.1 MEiN: 140

2. **Stępień Jakub, Pastuszek Żanna, Electroneurological changes in peripheral nerves in patients post-COVID**, J. Neurophysiol. 2023, vol. 129, nr 2, s. 392-398.

IF: 2.5 pkt. MEiN: 70

SPIS TREŚCI

Wykaz zastosowanych skrótów	6
Streszczenie	7
Summary	9
Wstęp	11
Cel pracy	14
Materiał i metody	15
Wyniki	17
Podsumowanie i wnioski	24
Bibliografia	25
Spis tabel	27
Załączniki	28
Opinia Komisji Bioetycznej	28
Oświadczenia współautorów publikacji	34
Kopie opublikowanych prac	36

WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

1. DSNP – distal symmetrical polineuropathy
2. COVID 19 – coronavirus disease 2019
3. NCS – nerve conduction study
4. ENG – elektroneurografia
5. TGF beta – transforming growth factor beta
6. TNF alpha – transforming nerve factor alpha
7. INF gamma – interferon gamma
8. PCR – polymerase chain reaction

STRESZCZENIE

Pierwsze badanie dotyczyło systemu klasyfikacji stopnia nasilenia zmian w nerwach obwodowych u chorych z cukrzycą. Polineuropatia rozwija się u 25% chorych z tą chorobą, a dystalna symetryczna polineuropatia cukrzycowa jest najczęstszą jej postacią. W diagnostyce DSNP najważniejsze są kryteria kliniczne. Badanie elektroneurograficzne stanowi uzupełnienie diagnostyki i odgrywa ważną rolę u pacjentów skąpo objawowych. Powstało wiele systemów klasyfikacji stopnia nasilenia zmian w DSNP, ale są one oparte głównie na kryteriach klinicznych. Większość z nich jest czasochłonna i wymaga wykonania szczegółowego badania neurologicznego. Brakuje prostego, obiektywnego, opartego na kryteriach neurofizjologicznych systemu klasyfikacji nasilenia zmian u chorych z polineuropatią cukrzycową, szczególnie w początkowym stadium choroby. W prezentowanym badaniu wzięło udział 113 chorych z DSNP. W grupie kontrolnej znalazło się 61 zdrowych ochotników. Wykonano badanie elektroneurograficzne nerwu pośrodkowego, łokciowego, łydkowego, piszczelowego i strzałkowego. Porównano wartości amplitudy odpowiedzi, szybkości przewodzenia, latencji dystalnej oraz latencji fali F w grupie badanej z grupą kontrolną. Nerwy uporządkowano w zależności od stopnia nasilenia zmian w badaniu elektroneurograficznym, co pozwoliło na utworzenie systemu klasyfikacji. Analiza statystyczna wykazała, że zarówno amplituda odpowiedzi, jak i szybkość przewodzenia we włóknach czuciowych nerwu łydkowego, strzałkowego, pośrodkowego i łokciowego, była obniżona w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej. Analiza statystyczna wykazała także obniżenie amplitudy, zwolnienie szybkości przewodzenia oraz wydłużenie latencji fali dystalnej i fali F w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej we włóknach ruchowych nerwu pośrodkowego, łokciowego, piszczelowego i strzałkowego. Najbardziej czułym parametrem uszkodzenia nerwów obwodowych u chorych z DSNP było obniżenie amplitudy odpowiedzi we włóknach czuciowych nerwu strzałkowego.

Drugie badanie miało na celu analizę uszkodzenia nerwów obwodowych u chorych, którzy przebyli COVID 19. Choroba ta zazwyczaj przebiega pod postacią infekcji dróg oddechowych, a najczęstsze jej powikłania to zapalenie płuc oraz zespół ostrej niewydolności

oddechowej. Powikłania neurologiczne obserwuje się w przypadku 36,4% chorych po infekcji SARS-CoV-2, ale częstość występowania polineuropatii jest nieznana. W grupie badanej znalazło się 45 osób, które przebyły COVID 19 w okresie maksymalnie do 6 miesięcy od badania elektroneurograficznego. Do grupy kontrolnej włączono 45 zdrowych ochotników. W prezentowanym badaniu zaobserwowano obniżenie amplitudy odpowiedzi, zwolnienie szybkości przewodzenia, zarówno we włóknach czuciowych jak i ruchowych oraz wydłużenie latencji dystalnej i latencji fali F we włóknach ruchowych w przypadku wszystkich badanych nerwów w porównaniu z grupą kontrolną. Amplituda odpowiedzi w nerwie łydkowym była najbardziej znamienne statystycznie obniżonym parametrem w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej. Badanie elektroneurograficzne wykazało uszkodzenie o zarówno aksonalnym jak i demielinizacyjnym charakterze w grupie chorych, którzy przebyli COVID 19. Z tego badania jasno wynika, że infekcja SARS-CoV-2 może skutkować uszkodzeniem obwodowego układu nerwowego.

Zarówno DSNP jak i neuropatia po COVID 19 to bardzo ważne problemy współczesnej neurofizjologii. Zaprezentowane badania dostarczyły informacji odnośnie patofizjologii tych chorób, ale także o charakterze zmian w nerwach obwodowych, stwierdzanych w badaniu elektroneurograficznym. Dane te umożliwiły także utworzenie systemu klasyfikacji nasilenia zmian w nerwach obwodowych u tych chorych.

SUMMARY

THE USE OF ELECTRONEUROGRAPHY IN THE ASSESSMENT OF DAMAGE TO THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM IN SPECIFIC DISEASES

Neuropathy affects 25% of people with diabetes mellitus. Distal symmetrical polyneuropathy (DSPN) is the most common presentation of the disease. The diagnosis of DSPN is primarily clinical, and its' most important part is the physical examination, including neurologic testing. Nerve conduction study plays an important role in the diagnostic process, especially in patients with minimal or no objective symptoms. Many screening instruments based mainly on clinical criteria have been developed to evaluate the severity of diabetic neuropathy. Most of them are time-consuming and require a precise neurological examination. There is a lack of a simple, objective scoring system using electroneurographic parameters that could help monitor disease progression with the use of objective criteria, especially in patients in the initial stage of DSPN. This retrospective study investigated a group of 113 patients with DSPN due to diabetes mellitus. Additionally, a control group of 61 healthy volunteers were included. The median, ulnar, sural, tibial, and peroneal nerves were examined. Parameters such as amplitude, conduction velocity, distal latency, and F wave latency were analyzed. The results of the nerve conduction study in the investigated group were compared to those of the controls. Nerves were ranked depending on the degree of impairment to create the scoring system. The analysis with the use of the Mann-Whitney U test revealed that both amplitude and conduction velocity of sensory action potentials of the sural, peroneal, median, and ulnar nerves were reduced in the investigated group when compared to controls. Moreover, the analysis with the use of the same test revealed a reduction in the amplitude and conduction velocity, as well as elongation of distal latency and F wave latency of motor action potentials in the tibial, peroneal, median, and ulnar nerves in comparison to controls. The most sensitive parameter of the severity of peripheral nerve impairments was the reduction of sensory action potential amplitude in the peroneal nerve. Based on that data, we have created diagnostic criteria for the impairment of all investigated nerves.

The second study was created to investigate the abnormalities in peripheral nerves in post COVID patients. The predominant clinical presentation of COVID-19 infection is a respiratory disease with the most common complications including pneumonia and acute respiratory distress syndrome. Although various neurological manifestations are observed in 36.4% of patients infected with SARS-CoV-2, the incidence of post COVID neuropathy remains unknown. The study group consisted of 45 patients who survived COVID-19 in maximal time of 6 month before NCS study while the control group consisted of 45 healthy volunteers. In our study, there was statistically significant reduction of amplitude and conduction velocity in both sensory and motor neuron fibers compared with control group in all examined nerves in upper and lower limbs. Moreover, distal latency and F wave latency were also increased compared with control group. All this abnormalities are typically for polyneuropathy and our results are similar to those described in the literature. The most significant reduction of NCS parameters was observed in case of sensory action potential amplitude of sural nerve. Moreover, that correlation was the most significant in case of amplitude and conduction velocity in sensory and motor neuron fibers both in arms and legs. In the study group, NCS showed both axonal loss and demyelinating features in COVID-19 survivors who had the symptoms of polyneuropathy. In our study it was obvious that SARS-CoV-2 can impair peripheral nerves fibers resulting in polyneuropathy.

DSNP as well as post COVID neuropathy are very important problems in neurophysiology. Presented study provided information about their pathophysiology and electroneurographic changes observed in peripheral nerves. Those data enabled to create a simple scoring system that can help to monitor disease severity.

WSTĘP

Diagnostyka i leczenie wszelkiego rodzaju neuropatii stanowi wciąż poważny problem współczesnej medycyny. Najczęstszą przyczyną uszkodzenia nerwów obwodowych jest cukrzyca. Szacuje się, że neuropatia obwodowa występuje u 25% pacjentów z tą chorobą [1,2]. Dystalna symetryczna polineuropatia (DSNP) jest najczęściej występującą postacią neuropatii u pacjentów chorych na cukrzycę [3,4]. Do najczęstszych objawów DSNP należą zaburzenia czucia, parestezje, bóle i osłabienie siły mięśniowej kończyn [5]. Pacjenci z DSNP mają zwiększone ryzyko owrzodzeń oraz infekcji tkanek miękkich kończyn [6,7]. Głównym czynnikiem ryzyka wystąpienia DSNP są nieprawidłowe wartości glikemii [8]. Etiopatogeneza choroby pozostaje nieznana. Biopsja nerwów obwodowych wykazuje degenerację zarówno zmielinizowanych jak i niezmielinizowanych włókien nerwowych [9,10]. U pacjentów z DSNP stwierdzono zaburzenia wydzielania cytokin. Osoby te mają wyższe stężenie interleukiny 1 (IL-1), interleukiny 6 (IL-6) oraz transformującego czynnika wzrostu beta (TGF beta) [11]. W diagnostyce choroby najważniejszą rolę ogrywają badanie fizykalne oraz elektroneurografia (ENG) [12]. Podczas badania elektroneurograficznego stosuje się stymulację badanego nerwu bodźcem elektrycznym oraz przeprowadza się rejestrację przewodzonego wzdłuż nerwu potencjału czynnościowego. Rejestruje się dzięki temu takie parametry jak: amplituda odpowiedzi, szybkość przewodzenia, latencja dystalna oraz latencja fali F [13]. Ocena stopnia nasilenia DSNP sprawia wiele trudności neurologom. Wszystkie dostępne systemy klasyfikacji DSNP oparte są na kryteriach klinicznych. Są one czasochłonne oraz wymagają wykonania bardzo szczegółowego badania neurologicznego. Badanie neurologiczne zawiera także element subiektywnej oceny stopnia nasilenia poszczególnych nieprawidłowości, przez co skale te są obarczone ryzykiem błędu. Brakuje prostego, obiektywnego, opartego na parametrach elektroneurograficznych systemu klasyfikacji stopnia nasilenia DSNP.

Polineuropatia cukrzycowa stanowi jedno z najważniejszych zagadnień neurofizjologii z uwagi na częstość jej występowania. Drugim, równie ważnym zagadnieniem, są zmiany w nerwach obwodowych u pacjentów, którzy przeszli infekcję wirusem SARS-CoV-2. Z uwagi na fakt, że COVID 19 występuje w populacji ludzkiej dopiero od trzech lat, wciąż niewiele

wiadomo na temat zmian, jakie ten wirus powoduje w nerwach obwodowych. Do najczęstszych powikłań neurologicznych u pacjentów, którzy przebyli COVID 19 należą bóle i zawroty głowy, parestezje kończyn, drgawki, zaburzenia węchu, encefalopatia, zespół Guillaina-Barrego [14]. Występują one u około 30% ozdrowieńców z infekcji wirusem SARS-CoV-2. Częstość występowania neuropatii nerwów obwodowych u tych chorych nie jest znana [15]. Etiopatogeneza neuropatii w przebiegu COVID 19 pozostaje nieznana. Pod uwagę bierze się teorię molekularnej mimikry i dysregulację układu immunologicznego. U pacjentów z neuropatią w przebiegu COVID 19 wykazano, że dochodzi do zwiększonej produkcji interleukiny 2 (IL-2), interleukiny 7 (IL-7), interferonu gamma (INF-gamma), czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF-alfa) [16]. Nie wiadomo w jaki sposób wirus przenika do ośrodkowego układu nerwowego. Dotychczas wyizolowano wirus SARS-CoV-2 z płynu mózgowo-rdzeniowego jedynie w przypadku dwóch chorych z COVID 19 [17]. Za najbardziej prawdopodobne uważa się wsteczny transport wirusa wzdłuż zainfekowanych nerwów, wnikanie wirusa przez opuszkę węchową, infekcję śródbłonna naczyniowego lub migrację zainfekowanych leukocytów przez barierę krew-mózg [18]. Istnieją także doniesienia naukowe pokazujące, że niedobór cynku może mieć wpływ na rozwój powikłań po COVID 19 [19]. Brakuje publikacji opisujących powikłania dotyczące obwodowego układu nerwowego po infekcji wirusem SARS-CoV-2. Konieczne jest zbadanie, jakie zachodzą zmiany w nerwach obwodowych u tych chorych, przy zastosowaniu nowoczesnych technik diagnostycznych, takich jak elektroneurografia.

Przedstawiona rozprawa doktorska to cykl publikacji dotyczący najważniejszych problemów współczesnej neurofizjologii. Zarówno neuropatia cukrzycowa jak i neuropatia związana z COVID 19, to ważne zagadnienia wymagające dalszych badań. Neuropatia cukrzycowa jest najczęstszym powikłaniem neurologicznym cukrzycy. Choruje na nią około 500 mln ludzi na świecie i ta liczba prawdopodobnie będzie się zwiększać z powodu coraz większej zapadalności na cukrzycę. Z uwagi na brak prostego, obiektywnego i opartego na kryteriach elektrofizjologicznych systemu klasyfikacji stopnia jej nasilenia, podjęto próbę opracowania takiej skali. Pozwoli ona na lepsze monitorowanie przebiegu DSNP i efektów jej leczenia. Neuropatia w przebiegu COVID 19 jest drugim ważnym zagadnieniem, które wymagało zbadania. Z uwagi na fakt, że pierwsze przypadki COVID 19 zarejestrowano dopiero

w 2019 roku i jest to choroba występująca w populacji od niedawna, wciąż niewiele o niej wiadomo. Wirus ma działanie neurotropowe i wywołuje zmiany w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Brakuje informacji odnośnie charakteru zmian w nerwach obwodowych. Konieczne są jasne wytyczne dla neurologów i neurofizjologów pomagające w diagnostyce choroby. W przypadku obu jednostek chorobowych konieczne jest opracowanie prostego, opartego na elektrofizjologicznych kryteriach systemu klasyfikacji nasilenia zmian w nerwach obwodowych. Umożliwiłoby to lepsze monitorowanie i leczenie tych jednostek chorobowych.

CEL PRACY

Celem pracy było udowodnienie hipotezy, że w przypadku DSNP w pierwszej kolejności dochodzi do uszkodzenia włókien czuciowych nerwów kończyn dolnych oraz stworzenia systemu klasyfikacji nasilenia zmian w nerwach obwodowych u chorych z cukrzycą. Stworzenie prostego, opartego na kryteriach elektrofizjologicznych systemu klasyfikacji stopnia ciężkości DSNP, pozwoliłoby na lepsze monitorowanie i leczenie tej choroby.

Kolejnym celem przedstawionych badań było zbadanie zmian w obwodowym układzie nerwowym u chorych, którzy przebyli COVID 19. Z uwagi na fakt, że przybywa chorych zgłaszających objawy neurologiczne po infekcji SARS-CoV-2, konieczne było zbadanie wpływu tego wirusa na neurony. Umożliwiłoby to poprawę monitorowania oraz leczenia chorych z neuropatią po COVID 19, a neurofizjologom dostarczyłoby informacji na temat nieprawidłowości, jakie można zaobserwować w badaniu neurograficznym u tych chorych.

MATERIAŁ I METODY

Distal symmetrical polyneuropathy in diabetes mellitus patients: Proposition of a new scoring system based on electroneurography findings

W pierwszym badaniu w grupie badanej znalazło się 113 pacjentów z dystalną symetryczną polineuropatią cukrzycową. Średnia wieku w tej grupie wyniosła 59.27 lat. W grupie kontrolnej znalazło się 61 zdrowych ochotników. Średnia wieku w tej grupie wyniosła 41.70 lat. Z badania wyłączono pacjentów z innymi niż cukrzyca przyczynami uszkodzenia nerwów obwodowych, takimi jak nadużywanie alkoholu, leczenie onkologiczne, choroby nerek lub tarczycy. U wszystkich osób wykonano badanie elektroneurograficzne nerwów pośrodkowego, łokciowego, łydkowego, piszczelowego i strzałkowego. Rozmieszczenie elektrod było standardowe [20]. Oceniano amplitudę odpowiedzi, szybkość przewodzenia, latencję dystalną oraz latencję fali F. Wyniki porównywano w obu grupach przy użyciu metod statystycznych, takich jak test t Student oraz U Mann-Whitney test.

Electroneurographical changes in peripheral nerves in patients post-COVID

W drugim badaniu do grupy badanej włączono 45 chorych, którzy przebyli COVID 19 maksymalnie do 6 miesięcy od infekcji SARS-CoV-2. Średnia wieku w tej grupie wyniosła 54.4 lata. U wszystkich badanych wystąpiły objawy uszkodzenia nerwów obwodowych, takie jak: parastezje, zaburzenia czucia, osłabienie siły mięśniowej kończyn. Pacjenci w grupie badanej przebyli infekcję COVID 19 potwierdzoną testem PCR o lekkim lub średnim nasileniu. Pacjenci z ciężkim przebiegiem COVID 19 byli wykluczeni z badania z uwagi na możliwość współistnienia neuropatii stanu krytycznego. Z badania wyłączono osoby z potencjalnymi przyczynami uszkodzenia nerwów obwodowych, takich jak cukrzyca, niedobór B12, alkoholizm, leczenie onkologiczne. W grupie kontrolnej znalazło się 45 zdrowych ochotników. Średnia wieku dla tej grupy wyniosła 52.6 lat. Pacjenci z tej grupy mieli wykonane badanie

elektroencefalograficzne w latach 2014-2018, kiedy infekcja COVID 19 nie występowała w populacji ludzkiej. W obu grupach wykonano badanie elektroencefalograficzne włókien nerwu pośrodkowego, łokciowego, strzałkowego i łydkowego. Rozmieszczenie elektrod było typowe [20]. Oceniano parametry: amplituda odpowiedzi, szybkość przewodzenia, latencja dystalna i latencja fali F w obu grupach. Wartości tych parametrów porównywano za pomocą testu U Mann-Whitney.

WYNIKI

Distal symmetrical polyneuropathy in diabetes mellitus patients: Proposition of a new scoring system based on electroneurography findings

Analiza przeprowadzona przy użyciu testu U Mann-Whitney i testu t Student wykazała, że zarówno amplituda odpowiedzi jak i szybkość przewodzenia we włóknach czuciowych nerwu łydkowego, strzałkowego, pośrodkowego i łokciowego były niższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza wykonana przy użyciu tych samych metod statystycznych, wykazała także obniżenie amplitudy odpowiedzi, zwolnienie szybkości przewodzenia, wydłużenie latencji dystalnej oraz latencji fali F we włóknach ruchowych nerwu strzałkowego, piszczelowego, pośrodkowego i łokciowego w porównaniu do grupy kontrolnej. Bazując na tych danych, opracowano kryteria diagnostyczne uszkodzenia dla wszystkich badanych nerwów (tabele 1-5). Średnia amplituda odpowiedzi czuciowej w grupie badanej była statystycznie znacząco niższa w porównaniu do grupy kontrolnej w przypadku wszystkich nerwów objętych badaniem. Największą redukcję amplitudy odpowiedzi zaobserwowano we włóknach czuciowych nerwu strzałkowego (72.8%, $p<0.005$) (tabela 1). Średnia amplituda odpowiedzi we włóknach ruchowych wszystkich badanych nerwów była znamienne statystycznie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Największą redukcję amplitudy odpowiedzi we włóknach ruchowych zaobserwowano w przypadku nerwu strzałkowego (45%, $p<0.005$) (tabela 2). Średnia szybkość przewodzenia w grupie badanej w przypadku włókien czuciowych wszystkich badanych nerwów była statystycznie niższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Największa redukcja szybkości przewodzenia została zaobserwowana we włóknach czuciowych nerwu pośrodkowego (19.6% $p<0.005$) (tabela 3). Średnia szybkość przewodzenia we włóknach ruchowych była statystycznie niższa w przypadku wszystkich badanych nerwów w porównaniu do grupy kontrolnej. Największą redukcję szybkości przewodzenia w porównaniu do grupy kontrolnej zaobserwowano w przypadku nerwu pośrodkowego (12.38%) i strzałkowego (12.17%) ($p<0.005$). W prezentowanym badaniu największą różnicę w parametrach przewodzenia w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną

zaobserwowano w przypadku amplitudy odpowiedzi, zarówno we włóknach czuciowych jak i ruchowych wszystkich badanych nerwów. Najbardziej czułym parametrem uszkodzenia obwodowego układu nerwowego było obniżenie amplitudy odpowiedzi we włóknach czuciowych nerwu strzałkowego. W przypadku pozostałych badanych nerwów redukcja amplitudy odpowiedzi była także znamienne statystycznie, zarówno we włóknach czuciowych jak i ruchowych. W przypadku szybkości przewodzenia, latencji dystalnej i latencji fali F różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolną nie były tak wyraźne. Na podstawie tych danych opracowano prosty system klasyfikacji nasilenia zmian w DSNP (tabela 5).

Tabela 1. Amplitudy potencjałów czuciowych w grupie badanej (uV) Mann-Whitney U test.

Nerw:	Grupa:	n	M	CI - 95%	CI 95%	Me	Q1	Q3	Znamiennosc statystyczna:
Pośrodkowy	badana	113	12,82	10,51	15,12	10,00	4,00	18,00	U=-5,58615, p=0,000000
	kontrolna	61	20,87	18,52	23,23	20,00	15,00	23,00	
Łokciowy	badana	110	12,86	10,36	15,36	9,00	5,00	16,00	U=-6,72478, p=0,000000
	kontrolna	61	22,96	20,83	25,09	23,00	17,00	27,00	
Strzałkowy	badana	113	3,19	2,58	3,80	2,00	0,50	5,00	U=-9,56193, p=0,000000
	kontrolna	61	10,73	9,72	11,75	9,00	7,30	14,00	
Łydkowy	badana	112	4,91	3,98	5,83	4,00	1,00	8,00	U=-8,37706, p=0,000000
	kontrolna	61	13,11	11,63	14,59	9,00	12,00	16,00	

Tabela 2. Amplitudy ruchowego potencjału czynnościowego w grupie badanej w porównaniu do kontrolnej (mV) Nerw Mann-Whitney U test.

Nerw:	Grupa:	n	M	CI - 95%	CI 95%	Me	Q1	Q3	Znamiennosc statystyczna:
Pośrodkowy	badana	112	7,07	6,61	7,54	6,90	5,60	8,80	U=-2,31339, p=0,020702
	kontrolna	61	8,31	7,62	9,00	7,80	6,00	10,30	
Łokciowy	badana	110	8,87	8,26	9,47	9,35	7,10	11,20	U=-4,04598, p=0,000052
	kontrolna	61	10,93	10,43	11,43	11,00	9,40	12,20	
Strzałkowy	badana	113	7,94	6,95	8,93	8,10	4,00	11,20	U=-7,21846, p=0,000000
	kontrolna	61	14,62	13,46	15,78	14,70	11,00	17,90	
Piszczelowy	badana	113	3,73	3,29	4,17	3,50	2,10	5,60	U=-3,54290, p=0,000396
	kontrolna	61	5,04	4,59	5,49	4,70	4,00	5,70	

Tabela 3. Szybkość przewodzenia we włóknach czuciowych w grupie badanej porównaniu do kontrolnej (ms) Mann-Whitney U test (nerw pośrodkowy i łokciowy) oraz t Student t test (nerw łydkowy i strzałkowy).

Nerw:	Grupa:	n	M	CI - 95%	CI 95%	Me	Q1	Q3	Znamiennosc statystyczna:
Pośrodkowy	badana	98	44,79	43,55	46,02	45,00	40,00	49,00	U=9,28889, p=0,000000
	kontrolna	61	55,72	54,64	56,81	56,00	52,00	59,00	
Łokciowy	badana	97	43,27	42,17	44,36	43,00	40,00	47,00	U=9,56644, p=0,000000
	kontrolna	61	54,25	53,25	55,25	54,00	51,50	57,00	
Strzałkowy	badana	84	41,48	40,29	42,67	42,00	37,50	45,00	t=-8,05598, p=0,000000
	kontrolna	61	48,50	47,29	49,72	48,00	45,00	52,00	
Łydkowy	badana	85	42,56	41,48	43,65	43,00	39,00	46,00	t=-7,14204, p=0,000000
	kontrolna	61	48,12	47,09	49,15	48,00	45,00	50,00	

Tabela 4. Szybkość przewodzenia we włóknach ruchowych w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej Mann-Whitney U test.

Nerw:	Grupa:	n	M	CI - 95%	CI 95%	Me	Q1	Q3	Analiza statystyczna:
Pośrodkowy	badana	110	51,43	50,26	52,60	52,00	48,00	55,00	U=-7,99026, p=0,000000
	kontrolna	61	58,70	57,84	59,56	58,00	56,00	61,00	
Łokciowy	badana	108	53,44	52,09	54,79	53,50	50,00	58,00	U=-3,59515, p=0,000324
	kontrolna	61	57,68	56,27	59,09	58,00	53,00	61,00	
Piszczelowy	badana	101	40,18	39,14	41,23	41,00	37,00	44,00	U=-7,86278, p=0,000000
	kontrolna	61	47,45	46,38	48,51	47,00	44,00	50,00	
Strzałkowy	badana	101	42,62	41,52	43,73	44,00	39,00	46,00	U=-6,55305, p=0,000000
	kontrolna	61	48,53	47,45	49,61	48,20	46,00	51,00	

Tabela 5. DSPN system oceny nasilenia zmian.

Nasilenie zmian w neuropatii	Kryteria
Stopień I (minimalny)	Obniżenie amplitudy odpowiedzi czuciowej we włóknach nerwu strzałkowego i łydkowego.
Stopień II (łagodny)	Obniżenie amplitudy odpowiedzi czuciowej w nerwach łydkowym i strzałkowym i amplitudy odpowiedzi czuciowej w przynajmniej jednym nerwie kończyny górnej.
Stopień III (średni)	Obniżenie amplitudy odpowiedzi czuciowej w nerwach łydkowym i strzałkowym i amplitudy odpowiedzi czuciowej w przynajmniej jednym nerwie kończyny górnej. Dodatkowo obniżenie amplitudy odpowiedzi ruchowej w nerwie piszczelowym lub strzałkowym.
Stopień IV (ciężki)	Obniżenie amplitudy odpowiedzi czuciowej w nerwach łydkowym i strzałkowym i amplitudy odpowiedzi czuciowej w przynajmniej jednym nerwie kończyny górnej. Dodatkowo obniżenie amplitudy odpowiedzi ruchowej w nerwie piszczelowym lub strzałkowym, a także w pośrodkowym lub łokciowym.
Stopień V (bardzo ciężki)	Brak odpowiedzi z włókien czuciowych i ruchowych kończyn dolnych oraz włókien czuciowych nerwów kończyn górnych. Odpowiedź z włókien ruchowych nerwów kończyn górnych może być obserwowana.

Electroneurographical changes in peripheral nerves in patients post-COVID

Analiza wykazała znamienne statystycznie obniżenie amplitudy oraz szybkości przewodzenia zarówno we włóknach czuciowych jak i ruchowych nerwu pośrodkowego ($p < 0.001$). Podobne zmiany wystąpiły w przypadku latencji dystalnej i latencji fali F, która była znamienne statystycznie bardziej wydłużona w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.001$). Parametrem, który najbardziej różnił się w stosunku do grupy kontrolnej była szybkość przewodzenia ($r = 0.93$). W przypadku nerwu łokciowego zaobserwowano znamienne statystycznie obniżenie amplitudy oraz szybkości przewodzenia zarówno we włóknach czuciowych jak i ruchowych. Podobne zmiany wystąpiły w przypadku latencji dystalnej i latencji fali F, która była znamienne statystycznie bardziej wydłużona w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.001$). Parametrem, który najbardziej różnił się w stosunku do grupy kontrolnej była szybkość przewodzenia ($r = 0.91$).

Analiza statystyczna wykazała znamienne statystycznie obniżenie amplitudy oraz szybkości przewodzenia we włóknach czuciowych nerwu łydkowego ($p < 0.001$). Parametrem, który najbardziej różnił się w stosunku do grupy kontrolnej była amplituda odpowiedzi ($r = 1.0$).

Analiza statystyczna wykazała znamienne statystycznie obniżenie amplitudy oraz szybkości przewodzenia we włóknach ruchowych nerwu piszczelowego ($p < 0.001$). Podobne zmiany wystąpiły w przypadku latencji dystalnej i latencji fali F, która była znamienne statystycznie bardziej wydłużona w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.001$). Parametrem, który najbardziej różnił się w stosunku do grupy kontrolnej była szybkość przewodzenia ($r = 0.79$). Wartości obliczeń dla parametrów przewodzenia w poszczególnych nerwach w grupie badanej i kontrolnej przedstawione są w tabelach 6-10.

Tabela 6. Porównanie wartości parametrów przewodzenia w nerwie pośrodkowym przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney'a.

	<i>U</i>		<i>p</i>	<i>r</i>
Amplituda odpowiedzi czuciowej [μ V]	332.5	***	< .001	0.67
Szybkość przewodzenia we włóknach czuciowych [m/s]	75.5	***	< .001	0.93
Latencja dystalna [ms]	321.5	***	< .001	0.68
Amplituda odpowiedzi ruchowej [mV]	659.5	**	0.007	0.33
Szybkość przewodzenia we włóknach ruchowych [m/s]	352.0	***	< .001	0.64
Latencja fali F [ms]	575.0	***	< .001	0.42

Tabela 7. Porównanie wartości parametrów przewodzenia w nerwie łokciowym przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney'a.

	<i>U</i>		<i>p</i>	<i>r</i>
Amplituda odpowiedzi czuciowej [μ V]	383.0	***	< .001	0.58
Szybkość przewodzenia we włóknach czuciowych [m/s]	80.5	***	< .001	0.91
Latencja dystalna [ms]	572.0	**	0.002	0.38
Amplituda odpowiedzi ruchowej [mV]	621.5	**	0.009	0.33
Szybkość przewodzenia we włóknach ruchowych [m/s]	263.5	***	< .001	0.71
Latencja fali F [ms]	642.0	*	0.015	0.30

Tabela 8. Porównanie wartości parametrów przewodzenia w nerwie strzałkowym przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney'a.

	<i>U</i>		<i>p</i>	<i>r</i>
Amplituda odpowiedzi czuciowej [μ V]	38.0	***	< .001	0.96
Szybkość przewodzenia we włóknach czasiowych [m/s]	353.5	***	< .001	0.65
Latencja dystalna [ms]	730.5	*	0.023	0.28
Amplituda odpowiedzi ruchowej [mV]	440.5	***	< .001	0.56
Szybkość przewodzenia we włóknach ruchowych [m/s]	271.0	***	< .001	0.73
Latencja fali F [ms]	641.0	**	0.003	0.37

Tabela 9. Porównanie wartości parametrów przewodzenia w nerwie łydkowym przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney'a.

	<i>U</i>		<i>p</i>	<i>r</i>
Amplituda odpowiedzi [μ V]	0.0	***	< .001	1.00
Szybkość przewodzenia [m/s]	172.0	***	< .001	0.82

Tabela 10. Porównanie wartości parametrów przewodzenia w nerwie piszczelowym przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney'a.

	<i>U</i>		<i>p</i>	<i>r</i>
Latencja dystalna [ms]	931.5		0.634	0.06
Amplituda odpowiedzi [mV]	532.5	***	< .001	0.46
Szybkość przewodzenia [m/s]	209.5	***	< .001	0.79
Latencja fali F [ms]	577.0	***	< .001	0.42

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Badanie elektrofizjologiczne odgrywa ważną rolę w diagnostyce i monitorowaniu postępu choroby u chorych z uszkodzeniem obwodowego układu nerwowego w przebiegu COVID 19 i cukrzycy. W zaprezentowanym badaniu wykazano, że infekcja wirusem SARS-CoV-2 może wiązać się z uszkodzeniem nerwów obwodowych. Zaobserwowano redukcję, zarówno amplitudy odpowiedzi jak i szybkości przewodzenia, zarówno we włóknach czuciowych jak i ruchowych wszystkich badanych nerwów w kończynach górnych i dolnych u chorych, którzy przeżyli COVID 19. Latencja dystalna i latencja fali F były znacząco statystycznie wydłużone w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Największe zmiany występowały w przypadku nerwu łydkowego. Tego typu odchylenia w badaniu elektrofizjologicznym są typowe dla polineuropatii. Badanie wykazało, że u chorych z COVID 19 dochodzi zarówno do zmniejszenia liczby aksonów jak i do uszkodzenia osłonek mielinowych. Jest to zgodne z danymi zawartymi w literaturze, gdzie w przypadku chorych z polineuropatią po COVID 19 występowały zmiany zarówno we włóknach czuciowych jak i ruchowych badanych nerwów oraz miały charakter symetryczny [15]. Dalszych badań wymaga wyjaśnienie mechanizmu, w którym wirus SARS-CoV 2 uszkadza obwodowy układ nerwowy. Do tej pory jedynie u dwóch osób z COVID 19 potwierdzono obecność wirusa w płynie mózgowo-rdzeniowym [14]. Konieczne jest także opracowanie systemu klasyfikacji nasilenia neuropatii, który pozwalałby na monitorowanie efektów leczenia w tej grupie chorych.

Odpowiedni system klasyfikacji polineuropatii cukrzycowej jest bardzo przydatny w codziennej praktyce lekarzy neurologów. Ułatwiłby monitorowanie przebiegu choroby i efektów leczenia u chorych z DSNP. Większość skal oceniających nasilenie zmian w polineuropatii opiera się na kryteriach, takich jak: zaburzenia czucia, zaburzenia funkcji motorycznych, obecności odruchów głębokich w badaniu neurologicznym [20]. Są to kryteria subiektywne, przez co skale te mogą być mało precyzyjne. Z tego powodu wiele z utworzonych skal, mających na celu ocenę nasilenia zmian w polineuropatii cukrzycowej, nie jest używanych w codziennej praktyce klinicznej. Badanie elektroneurograficzne cechuje się wysoką czułością, co pozwala na precyzyjne monitorowanie przebiegu choroby. Zaprezentowana skala jest oparta wyłącznie na kryteriach elektrofizjologicznych i najlepiej odzwierciedla progresję choroby u chorych z DSNP. Konieczne są dalsze badania oceniające możliwość zastosowania tej skali w przypadku polineuropatii o innej etiologii.

BIBLIOGRAFIA

1. Snyder MJ, Gibbs LM, Lindsay TJ. Treating painful diabetic peripheral neuropathy: An update. *Am Fam Physician*. 2016;94(3):227–234.
2. Hicks CW, Selvin E. Epidemiology of peripheral neuropathy and lower extremity disease in diabetes. *Curr Diab Rep*. 2019;19(10):86.
3. Kaku M, Vinik A, Simpson DM. Pathways in the diagnosis and management of diabetic polyneuropathy. *Curr Diab Rep*. 2015;15(6):609.
4. Boulton AJM, Kempner P, Ametov A, Ziegler D. Whither pathogenetic treatments for diabetic polyneuropathy? *Diabetes Metab Res Rev*. 2013;29(5):327–333.
5. Liu S, Kuja-Halkola R, Larsson H, et al. Poor glycaemic control is associated with increased risk of neurodevelopmental disorders in childhood-onset type 1 diabetes: A population-based cohort study. *Diabetologia*. 2021;64(4):767–777.
6. Archer AG, Watkins PJ, Thomas PK, Sharma AK, Payan J. The natural history of acute painful neuropathy in diabetes mellitus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1983;46(6):491–499.
7. Bril V, Perkins BA. Validation of the Toronto Clinical Scoring System for diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care*. 2002;25(11):2048–2052.
8. Goel J, Anadure RK, Nair MD, Nair S, Yasha TC. A study correlating nerve biopsy with clinical diagnosis and its impact on improving management in peripheral neuropathies. *Interdiscip Neurosurg*. 2021; 25:101237.
9. McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: Normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol*. 1998;55(12):1513–1520.
10. Peltier AC, Myers MI, Artibee KJ, et al. Evaluation of dermal myelinated nerve fibers in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst*. 2013;18(2): 162–167.
11. Rutkove SB. Effects of temperature on neuromuscular electrophysiology. *Muscle Nerve*. 2001;24(7):867–882.

12. Valk GD, De Sonnaville JJJ, Van Houtum WH, et al. The assessment of diabetic polyneuropathy in daily clinical practice: Reproducibility and validity of Semmes Weinstein monofilaments examination and clinical neurological examination. *Muscle Nerve*. 1997;20(1):116–118.
13. Van De Poll-Franse LV, Valk GD, Renders CM, Heine RJ, Van Eijk JTM. Longitudinal assessment of the development of diabetic polyneuropathy and associated risk factors. *Diabet Med*. 2002;19(9):771–776.
14. Chen X, Laurent S, Onur OA, Kleineberg NN, Fink GR, Schweitzer F, Warnke C. A systematic review of neurological symptoms and complications of COVID-19. *J Neurol* 268: 392–402, 2021.
15. Bureau BL, Obeidat A, Dhariwal MS, Jha P. Peripheral neuropathy as a complication of SARS-CoV-2. *Cureus* 12: e11452, 2020.
16. Maury A, Lyoubi A, Peiffer-Smadja N, de Broucker T, Meppiel E. Neurological manifestations associated with SARS-CoV-2 and other coronaviruses: a narrative review for clinicians. *Rev Neurol (Paris)* 177: 51–64, 2021.
17. Finsterer J, Scorza FA, Scorza CA, Fiorini AC. Peripheral neuropathy in COVID-19 is due to immune-mechanisms, pre-existing risk factors, anti-viral drugs, or bedding in the Intensive Care Unit. *Arq Neuropsiquiatr* 79: 924–928, 2021.
18. Matschke J, Lutgehetmann M, Hagel C, Sperhake JP, Schroder AS, Edler C, Mushumba H, Fitzek A, Allweiss L, Dandri M, Dottermusch M, Heinemann A, Pfefferle S, Schwabenland M, Sumner Magruder D, Bonn S, Prinz M, Gerloff C, Puschel K, Krasemann S, Aepfelbacher M, Glatzel M. Neuropathology of patients with COVID 19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol* 19: 919–929, 2020.
19. Jothimani D, Kailasam E, Danielraj S, Nallathambi B, Ramachandran H, Sekar P, Manoharan S, Ramani V, Narasimhan G, Kaliamoorthy I, Rela M. COVID-19: poor outcomes in patients with zinc deficiency.
20. Herman WH, Pop-Busui R, Braffett BH, et al. Use of the Michigan Neuropathy Screening Instrument as a measure of distal symmetrical peripheral neuropathy in type 1 diabetes: Results from the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications. *Diabet Med*. 2012;29(7):937–944.

SPIS TABEL

Tabela 1. Amplitudy potencjałów czuciowych w grupie badanej (uV) Mann-Whitney U test	18
Tabela 2. Amplitudy ruchowego potencjału czynnościowego w grupie badanej w porównaniu do kontrolnej (mV) Nerw Mann-Whitney U test	19
Tabela 3. Szybkość przewodzenia we włóknach czuciowych w grupie badanej porównaniu do kontrolnej (ms) Mann-Whitney U test (nerw pośrodkowy i łokciowy) oraz t Student t test (nerw łydkowy i strzałkowy)	19
Tabela 4. Szybkość przewodzenia we włóknach ruchowych w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej Mann-Whitney U test	20
Tabela 5. DSPN system oceny nasilenia zmian	20
Tabela 6. Porównanie wartości parametrów przewodzenia w nerwie pośrodkowym przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney’a	22
Tabela 7. Porównanie wartości parametrów przewodzenia w nerwie łokciowym przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney’a	22
Tabela 8. Porównanie wartości parametrów przewodzenia w nerwie strzałkowym przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney’a	23
Tabela 9. Porównanie wartości parametrów przewodzenia w nerwie łydkowym przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney’a	23
Tabela 10. Porównanie wartości parametrów przewodzenia w nerwie piszczelowym przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney’a	23

ZAŁĄCZNIKI

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

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

ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa

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

Warszawa, dnia 09.10.2023

AKBE/ 275 / 2023

Lek. Jakub Stępień
Praktyka Lekarska
ul. Kłobucka 23C lok.106
02-699 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w dniu 09 października 2023 r. przyjęła do wiadomości informację na temat badania pt "Symetryczna polineuropatia dystalna (DSNP) u pacjentów z cukrzycą- propozycja nowej klasyfikacji opartej na badaniu elektrofizjologicznym." Przedstawione badanie nie stanowi eksperymentu medycznego w rozumieniu art. 21 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz.U. z 2018 r poz. 617) i nie wymaga uzyskania opinii Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, o której mowa w art. 29 ust.1 ww. ustawy.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej


Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz

KOMISJA BIOETYCZNA
przy Wojskowym Instytucie Medycznym
04-141 Warszawa 44, ul. Szaserów 128
Regon: 015294487; NIP 113-23-93-221
tel. 261 817 380

UCHWAŁA NR 14/WIM/2021

Komisji Bioetycznej przy Wojskowym Instytucie Medycznym z dnia 21.04.2021 r.

w sprawie wyrażenia opinii o projekcie badania klinicznego zgłoszonego przez:

lek. Jakuba STĘPNIA

zatrudnionego w Szpitalnym Oddziale Ratunkowym Centralnego Szpitala Klinicznego Ministerstwa Obrony Narodowej Wojskowy Instytut Medyczny, ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa.

Na podstawie art. 29 ust. 2 ustawy z dn. 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28, poz. 152 z późn. zm.) oraz § 6 ust. 5 rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z 11 maja 1999 roku w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480) uchwała się, co następuje:

§ 1

Komisja Bioetyczna Wojskowego Instytutu Medycznego – zwanej dalej „Komisją” w składzie:

Przewodniczący:
Wiceprzewodniczący:
Członkowie:

prof. dr hab. med. Dariusz Jurkiewicz
mec. Andrzej Niewiadomski
plk prof. dr hab. med. Marek Rękas
prof. dr hab. med. Piotr Rzepecki
prof. dr hab. med. Adam Stępień
prof. dr hab. med. Karina Jahnz-Różyk
prof. dr hab. med. Witold Tlustochowicz
dr hab. med. Andrzej Cwetsch
dr hab. med. Andrzej Chciałowski
dr hab. med. Renata Duchnowska
dr hab. med. Agnieszka Woźniak - Kosek
plk dr hab. med. Witold Owczarek
dr n. o zdr. (mgr piel.) Olga Dembicka
ks. dr Jan Dohnalik
mgr farm. Ewa Pomorska

Pielęgniarka:
Kapelan:

zapoznała się z projektem badania klinicznego pt.: **„Ocena wpływu przeczaskowej stymulacji magnetycznej na ukrwienie i utlenowanie mózgu oraz funkcjonowanie obwodowego układu nerwowego u pacjentów post – COVID z jednoczesnym wykorzystaniem nieinwazyjnej techniki spektroskopii w bliskiej podczerwieni oraz elektroneurografii”**

do którego dołączone zostały następujące dokumenty:

- Informacja o badaniu,
- Informacja dla pacjenta,
- Formularz świadomej zgody na udział w badaniu.

§ 2

Badanie finansowane jest ze środków własnych.

§ 3

Komisja przeanalizowała projekt, o którym mowa § 1 w oparciu o Deklarację Helsińską z roku 1996 i zasady opracowane przez Unię Europejską pt.: „Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community. The Rules Governing Medicinal Products in the European Community”, Vol. III, 1990, zatwierdzone przez Komisję Etyczną w Polsce od 1 stycznia 1993 roku.

§ 4

Każde poważniejsze powikłanie nie wchodzące w zakres znanych i mogących wystąpić skutków leczenia badanym lekiem, powinno być natychmiast zgłoszone Komisji Bioetycznej. Komisja zastrzega sobie zmianę badań lub ich wstrzymanie.

§ 5

Każde pojedyncze badanie musi być poprzedzone wyjaśnieniem przez lekarza pacjentowi o zakresie badań klinicznych i wymaga podpisu przez pacjenta i lekarza protokołu świadomej zgody. Po zakończeniu badań Zespół prowadzący projekt zobowiązany jest dołączyć do badania opublikowane kończące opracowanie.

§ 6

Komisja:

1) oceniając pod względem etycznym, celowości oraz wykonalność projektu badania klinicznego dotyczącego: „**Ocena wpływu przezczaszkowej stymulacji magnetycznej na ukrywanie i utlenowanie mózgu oraz funkcjonowania obwodowego układu nerwowego u pacjentów post – COVID z jednoczesnym wykorzystaniem nieinwazyjnej techniki spektroskopii w bliskiej podczerwieni oraz elektroneurografii**”,

2) na podstawie opinii Recenzenta o projekcie i członków Komisji,
postanawia wyrazić pozytywną opinię o wymienionym w § 1 projekcie badania.

§ 7

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia i obowiązuje w okresie trwania badania tj. do września 2021 roku.

Uchwałę podjęto w głosowaniu tajnym.

Za przyjęciem opinii głosowało12..... członków Komisji.
Za odrzuceniem opinii głosowało członków Komisji.

W głosowaniu, które odbyło się drogą elektroniczną i w którym uczestniczyła ponad połowa członków Komisji pod przewodnictwem przewodniczącego z udziałem, co najmniej dwóch członków Komisji niebędących lekarzami.

PRZEWODNICZĄCY
KOMISJI BIOETYCZNEJ PRZY
Wojskowym Instytucjom Medycznym


prof. dr hab. n. med. Dariusz JURKIEWICZ

KOMISJA BIOETYCZNA
 przy Wojskowym Instytucie Medycznym
 04-141 Warszawa 44, ul. Szaserów 128
 Regon: 015294487; NIP 113-23-93-221
 tel. 261 817 380

SKŁAD KOMISJI BIOETYCZNEJ PODEJMUJĄCEJ DECYZJĘ

WARSZAWA, dnia 21.04.2021 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Zawód	Miejsce pracy
1.	prof. dr hab. med. Dariusz Jurkiewicz	Lekarz/Otolaryngolog	Wojskowy Instytut Medyczny
2.	mec. Andrzej Niewiadomski	Rada Prawny	Departament Kadr MON
3.	plk prof. dr hab. med. Marek Rękas	Lekarz/Okulista	Wojskowy Instytut Medyczny
4.	prof. dr hab. med. Piotr Rzepecki	Lekarz/Hematolog	Wojskowy Instytut Medyczny
5.	prof. dr hab. med. Adam Stepien	Lekarz/Neurolog	Wojskowy Instytut Medyczny
6.	prof. dr hab. med. Karina Jahnz - Różyk	Lekarz/Alergolog -Immunolog	Wojskowy Instytut Medyczny
7.	prof. dr hab. med. Witold Thustochowicz	Lekarz/Reumatolog	Wojskowy Instytut Medyczny
8.	dr hab. med. Andrzej Cwetsch	Lekarz/Kardiolog	Wojskowy Instytut Medyczny
9.	dr hab. med. Andrzej Chciałowski	Lekarz/ Pulmonolog – Alergolog	Wojskowy Instytut Medyczny
10.	dr hab. med. Renata Duchnowska	Lekarz/Onkolog	Wojskowy Instytut Medyczny
11.	dr hab. med. Agnieszka Woźniak-Kosek	Mikrobiolog	Wojskowy Instytut Medyczny
12.	plk dr hab. med. Witold Owczarek	Lekarz/Dermatolog	Wojskowy Instytut Medyczny
13.	dr n. o zdr. Olga Dembicka	Pielęgniarka	Wojewódzki Szpital Chirurgii Urazowej w Warszawie
14.	ks. dr Jan Dohnalik	Kapelan	Ordynariat Polowy WP
15.	mgr farm. Ewa Pomorska	Farmaceuta	Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus w Warszawie

LISTA

obecności na posiedzeniu Komisji Bioetycznej przy WIM w dn. 21.04.2021 roku (głosowanie internetowe)

- 1/ prof. dr hab. med. Dariusz Jurkiewicz
- 2/ mec. Andrzej Niewiadomski
- 3/ prof. dr hab. med. Piotr Rzepecki,
- 4/ prof. dr hab. med. Adam Stępień
- 5/ prof. dr hab. med. Karina Jahnz – Różyk
- 6/ prof. dr hab. med. Witold Tłustołowicz
- 7/ dr hab. med. Andrzej Chciałowski
- 8/ dr hab. med. Andrzej Cewtsch
- 9/ prof. dr hab. med. Renata Duchnowska
- 10/ dr hab. med. Agnieszka Woźniak-Kosek
- 11/ dr n. o zdr. (mgr piel.) Olga Dembicka
- 12/ ks. dr Jan Dohnalik
- 13/ mgr farm. Ewa Pomorska

Potwierdzam zgodność

PRZEWODNICZĄCY
KOMISJI BIOETYCZNEJ PRZY
Wojewódzkim Instytucie Medycznym


prof. dr hab. n. med. Dariusz JURKIEWICZ

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI

Warszawa, 01.12.2023 r.
(miejsowość, data)

Żanna Pastuszek-Stępień
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Distal symmetrical polyneuropathy in diabetes mellitus patients: Proposition of a new scoring system based on electroneurography findings* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wykonanie badań elektrofizjologicznych, interpretacja wyników badań.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30%.

Wkład Jakuba Stępnia w powstawanie publikacji określam jako 70%,

obejmował on określenie celu badawczego, nadzorowaniu prac badawczych, opracowanie i interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji naukowych.

*(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)**

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

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....
(podpis oświadczającego)

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

Warszawa, 01.12.2023 r.
(miejsowość, data)

Żanna Pastuszek-Stępień
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Electroneurographical changes in peripheral nerves in patients post-COVID* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wykonanie badań elektrofizjologicznych, interpretacja wyników badań.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30%.

Wkład Jakuba Stępnia w powstawanie publikacji określam jako 70%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on określenie celu badawczego, nadzorowaniu prac badawczych, opracowanie i interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji naukowych.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

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

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....
(podpis oświadczającego)

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

Distal symmetrical polyneuropathy in diabetes mellitus patients: Proposition of a new scoring system based on electroneurography findings

Jakub Stepień^{1,A,B-D}, Żanna Pastuszek^{2,A-C,E,F}

¹ Insula Clinical Trials Center, Warsaw, Poland

² Laboratory of Preclinical Research and Environmental Agents, Mossakowski Medical Research Institute, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Advances in Clinical and Experimental Medicine, ISSN 1899–5276 (print), ISSN 2451–2680 (online)

Adv Clin Exp Med. 2024

Address for correspondence

Jakub Stepień
E-mail: jakub.stepien@o2.pl

Funding sources

None declared

Conflict of interest

None declared

Received on December 20, 2022

Reviewed on April 5, 2023

Accepted on June 19, 2023

Published online on July 24, 2023

Abstract

Background. Neuropathy affects 25% of people with diabetes mellitus. The evaluation of disease severity is still a challenge for modern medicine. Many screening instruments are based primarily on clinical criteria. There is a lack of a simple, reliable and precise scoring system that could improve the classification of neuropathy and monitor disease progression using not only clinical criteria but also electroneurography. There is a need to find sensitive neurography parameters that reflect peripheral nerve impairments in this group of patients.

Objectives. This study aimed to create a scoring system for diabetic neuropathy, based on electroneurography criteria, that reflects the natural course of the disease. A new scoring system will improve the treatment of patients with diabetes mellitus.

Materials and methods. A total of 113 patients with distal symmetrical polyneuropathy (DSPN) were involved in the study. Median, ulnar, sural, tibial, and peroneal nerves were examined. Parameters such as amplitude, conduction velocity, distal latency, and F wave latency were analyzed. The results of nerve conduction studies in the investigated group were compared to those of the control group, which consisted of 61 healthy volunteers.

Results. The most sensitive parameter of peripheral nerve impairment severity was a reduction of the sensory action potential amplitude in the peroneal nerve by 72.8% ($p < 0.05$). The observation of changes in sensory action potential amplitudes in the peroneal nerve is the most important element of our scoring system.

Conclusions. A new electroneurography scoring system of DSPN severity should be based on sensory and motor action potential amplitudes that reflect axonal loss in the examined nerves and the nature of the disease.

Key words: diabetes mellitus, classification, peroneal nerve, nerve conduction studies, diabetic neuropathies

Cite as

Stepień J, Pastuszek Ż. Distal symmetrical polyneuropathy in diabetes mellitus patients: Proposition of a new scoring system based on electroneurography findings [published online ahead of print on July 24, 2023]. *Adv Clin Exp Med.* 2024. doi:10.17219/acem/168504

DOI

10.17219/acem/168504

Copyright

Copyright by Author(s)

This is an article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

Background

Neuropathy affects 25% of people with diabetes mellitus. This disease is the leading known cause of neuropathy in developed countries and is implicated in 50–75% of nontraumatic amputations.^{1–4} Distal symmetrical polyneuropathy (DSPN) is the most common presentation of the disease. A glove–stocking distribution of numbness, sensory loss, dysesthesia, loss of reflexes, and nighttime pain are the most common symptoms.^{5,6} Ulcers, infections, as well as fractures of the knees, ankles or feet are the most common complications of the disease. Distal symmetrical polyneuropathy is associated with significant morbidity and increased mortality. The most important risk factor for developing DSPN in type 1 diabetes mellitus is poor glycemic control.^{7–9} Pathophysiology of the disease remains elusive, but nerve biopsies from patients with diabetic neuropathy revealed degeneration of both myelinated and unmyelinated fibers.^{10–12} Peripheral nerve impairment in patients with diabetes mellitus may be connected to mitochondrial malfunction. This organelle is responsible for the production of energy. Its dysfunction is connected to the activation of the tryptophan–kynurenine metabolic system that has an impact on tryptophan metabolism.^{13–15} Tryptophan is an endogenous amino acid necessary for protein synthesis and a precursor to the synthesis of bioactive molecules, including nicotinamide adenine dinucleotide.¹⁶ It undergoes transformations, leading to the formation of kynurenines, the role of which is to regulate the excitability of neurons as well as the response of immune cells.¹⁷ Kynurenine has a role in processing neurogenic inflammation by affecting glutamate receptors.^{18–20}

In another study, the increased plasma levels of proinflammatory factors such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) were connected to polyneuropathy incidence in diabetes patients.²¹ Metabolic changes induced by hyperglycemia lead to dysregulation of cytokine control. Another study revealed that in patients with DSPN, interleukin (IL)-1, IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), and transforming growth factor beta (TGF- β) production is more intense than in healthy patients.^{22,23} A study by Behse and Buchthal revealed that in the blood of patients with diabetic polyneuropathy, the levels of IL-10 were lower than in healthy individuals.²⁴ A clinical investigation of nerve biopsies in neuropathic patients revealed upregulated TNF- α expression in human Schwann cells.²⁵

The diagnosis of DSPN is primarily clinical, and its most important part is the physical examination, including neurologic testing. Nerve conduction studies (NCSs) play an important role in the diagnostic process, especially in patients with minimal or no objective symptoms, and are the most useful in patients with large fiber neuropathy.^{26–29} Other forms of neuropathy that occur in diabetes mellitus include mononeuropathies, cranial neuropathies,

plexopathies, radiculopathy, amyotrophy, autonomic neuropathy, and small fiber neuropathy. Moreover, chronic inflammatory demyelinating neuropathy is more common in diabetic patients.^{30–32}

Many screening instruments based mainly on clinical criteria have been developed to evaluate the severity of diabetic neuropathy. Most of them are time-consuming and require a precise neurological examination. There is a lack of a simple, objective scoring system using electro-neurographic parameters that could help monitor disease progression with the use of objective criteria, especially in patients in the initial stage of DSPN.^{33,34}

Objectives

This study aimed to confirm the hypothesis that DSPN affects primarily sensory nerve fibers in the legs and leads mainly to axonal loss.^{35,36} Our study is an attempt to create a simple scoring system with the use of objective parameters of nerve conduction that will reflect the natural course of the disease.³⁷ We propose a simple, clear system of the classification of the severity of neuropathy that can be used by neurologists and other clinical practitioners to evaluate the severity of neuropathy and monitor disease progression in patients with DSPN.³⁸

Materials and methods

This retrospective study investigated a group of 113 patients (53 females and 60 males) with DSPN due to diabetes mellitus. All patients in the investigated group were diagnosed at the Electromyography and Nerve Conduction Laboratory in Warsaw, Poland. The mean age in the group was 59.27 years (standard deviation (SD) \pm 13.66). Additionally, a control group of 61 healthy volunteers with a mean age of 41.70 (\pm 18.37) years were included. The size of the study and control groups was estimated based on statistical methodology. Patients with alcohol addiction, post-oncologic treatment, kidney and thyroid diseases, and other potential causes of peripheral nerve impairments were excluded from the study. In all patients, a NCS was performed after obtaining the approval of the Bioethical Committee of Military Institute of Medicine (approval No. 14/WIM/2021). The median, ulnar, sural, tibial, and peroneal nerves were examined. Parameters such as amplitude, conduction velocity, distal latency, and F wave latency were analyzed.

Sensory studies were performed antidromically. In the case of the ulnar nerve sensory action potential, the recording electrode was placed on the 5th finger, while for the median nerve, it was placed on the 2nd finger. The sural nerve was stimulated on the posterolateral aspect of the lower third of the leg, and the distance between the recording electrode and the stimulating one

was approx. 14 cm. For ulnar nerve motor fibers, the recording electrode was placed over the abductor digiti minimi muscle. In the case of median nerve motor fibers, the recording electrode was placed over the abductor pollicis brevis muscle. For the peroneal nerve, the recording electrode was placed over the extensor digitorum brevis, whereas the abductor hallucis muscle was used for the placement of the recording electrode for the tibial nerve. The distance between the recording electrode and the stimulating electrode was 8 cm in the testing of all motor nerves. Locations of stimulating and recording electrodes in the case of all examined nerves were typical, as presented in previous studies.^{39,40} Motor and sensory NCSs were performed in an environment with a temperature of 21–25°C, as are the optimal parameters for electroneurography.⁴¹

The results of the NCSs in the investigated group were compared to those of the controls. Nerves were ranked depending on the degree of impairment to create the scoring system. Normal distribution of variables was obtained in the case of the conduction velocity in sensory fibers, as well as F wave latency of the median nerve, F wave latency of the ulnar nerve, conduction velocity in sensory fibers of the peroneal nerve, and conduction velocity in sensory fibers of the sural nerve. In the remaining cases, the distribution of variables was non-normal. Student's t-test or Mann–Whitney U tests were used to statistically analyze the data.

Results

The analysis with the use of the Mann–Whitney U test revealed that both amplitude and conduction velocity of sensory action potentials of the sural, peroneal, median, and ulnar nerves were reduced in the investigated group when compared to controls. Moreover, the analysis with the use of the same test revealed a reduction in the amplitude and conduction velocity, as well as elongation of distal latency and F wave latency of motor action potentials in the tibial, peroneal, median, and ulnar nerves in comparison to controls. Based on that data, we have created diagnostic criteria for the impairment of all investigated nerves (Tables 1–5). In the case of the conduction velocity of sensory action potentials, the differences between the 2 analyzed groups were compared using the Student's t-test (regarding the peroneal and sural nerves). The Mann–Whitney U test was used in the case of all other nerves (Table 3).

The mean amplitude of sensory action potentials in the investigated group was significantly lower in comparison to controls. The most significant reduction of amplitude in the investigated group compared to controls was observed in the peroneal nerve (72.8%, $p < 0.05$ using the Mann–Whitney U test).

Moreover, the values of sensory action potential amplitudes for the sural, peroneal, median, and ulnar nerves where impairment was present are depicted in Table 1 and Fig. 1.

Table 1. Amplitude of sensory action potential in investigated and control groups [μ V] using Mann–Whitney U test

Nerve	Group	n	M	95% CI	95% CI	Me	Q1	Q3	Statistical significance
Median	investigated	113	12.82	10.51	15.12	10.00	4.00	18.00	U = -5.58615, p = 0.000000
	control	61	20.87	18.52	23.23	20.00	15.00	23.00	
Ulnar	investigated	110	12.86	10.36	15.36	9.00	5.00	16.00	U = -6.72478, p = 0.000000
	control	61	22.96	20.83	25.09	23.00	17.00	27.00	
Peroneal	investigated	113	3.19	2.58	3.80	2.00	0.50	5.00	U = -9.56193, p = 0.000000
	control	61	10.73	9.72	11.75	9.00	7.30	14.00	
Sural	investigated	112	4.91	3.98	5.83	4.00	1.00	8.00	U = -8.37706, p = 0.000000
	control	61	13.11	11.63	14.59	12.00	9.00	16.00	

95% CI – 95% confidence interval; Me – median; M – mean.

Table 2. Amplitude of motor action potential in investigated and control groups [mV] using Mann–Whitney U test

Nerve	Group	n	M	95% CI	95% CI	Me	Q1	Q3	Statistical significance
Median	investigated	112	7.07	6.61	7.54	6.90	5.60	8.80	U = -2.31339, p = 0.020702
	control	61	8.31	7.62	9.00	7.80	6.00	10.30	
Ulnar	investigated	110	8.87	8.26	9.47	9.35	7.10	11.20	U = -4.04598, p = 0.000052
	control	61	10.93	10.43	11.43	11.00	9.40	12.20	
Peroneal	investigated	113	7.94	6.95	8.93	8.10	4.00	11.20	U = -7.21846, p = 0.000000
	control	61	14.62	13.46	15.78	14.70	11.00	17.90	
Tibial	investigated	113	3.73	3.29	4.17	3.50	2.10	5.60	U = -3.54290, p = 0.000396
	control	61	5.04	4.59	5.49	4.70	4.00	5.70	

95% CI – 95% confidence interval; Me – median; M – mean.

Table 3. Conduction velocity of sensory action potentials in investigated and control groups [ms] using Mann–Whitney U test (median, ulnar nerves) and Student's t test (peroneal, sural nerves)

Nerve	Group	n	M	95% CI	95% CI	Me	Q1	Q3	Statistical significance
Median	investigated	98	44.79	43.55	46.02	45.00	40.00	49.00	U = 9.28889, p = 0.000000
	control	61	55.72	54.64	56.81	56.00	52.00	59.00	
Ulnar	investigated	97	43.27	42.17	44.36	43.00	40.00	47.00	U = 9.56644, p = 0.000000
	control	61	54.25	53.25	55.25	54.00	51.50	57.00	
Peroneal	investigated	84	41.48	40.29	42.67	42.00	37.50	45.00	t = -8.05598, p = 0.000000
	control	61	48.50	47.29	49.72	48.00	45.00	52.00	
Sural	investigated	85	42.56	41.48	43.65	43.00	39.00	46.00	t = -7.14204, p = 0.000000
	control	61	48.12	47.09	49.15	48.00	45.00	50.00	

95% CI – 95% confidence interval; Me – median; M – mean.

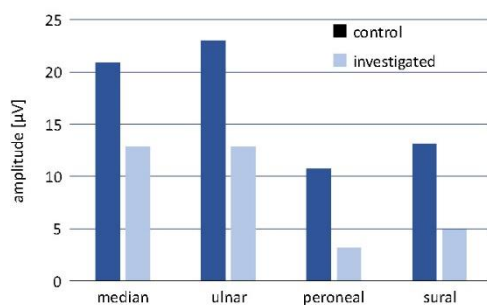
Table 4. Conduction velocity of motor action potentials in investigated and control group [ms] using Mann–Whitney U test

Nerve	Group	n	M	95% CI	95% CI	Me	Q1	Q3	Statistical significance
Median	investigated	110	51.43	50.26	52.60	52.00	48.00	55.00	U = -7.99026, p = 0.000000
	control	61	58.70	57.84	59.56	58.00	56.00	61.00	
Ulnar	investigated	108	53.44	52.09	54.79	53.50	50.00	58.00	U = -3.59515, p = 0.000324
	control	61	57.68	56.27	59.09	58.00	53.00	61.00	
Tibial	investigated	101	40.18	39.14	41.23	41.00	37.00	44.00	U = -7.86278, p = 0.000000
	control	61	47.45	46.38	48.51	47.00	44.00	50.00	
Peroneal	investigated	101	42.62	41.52	43.73	44.00	39.00	46.00	U = -6.55305, p = 0.000000
	control	61	48.53	47.45	49.61	48.20	46.00	51.00	

95% CI – 95% confidence interval; Me – median; M – mean.

Table 5. Distal symmetrical polyneuropathy (DSPN) scoring system

Neuropathy severity	Criteria
Grade I (minimal)	reduction of sensory action potential amplitude of peroneal and sural nerves
Grade II (mild)	reduction of sensory action potential amplitude of peroneal and sural nerves and of sensory fibers in at least 1 nerve in upper limbs
Grade III (moderate)	reduction of sensory action potential amplitude of peroneal and sural nerves and of sensory fibers in at least 1 nerve in upper limbs; additionally, the reduction of motor potential amplitude in peroneal or tibial nerves must be observed
Grade IV (severe)	reduction of sensory action potential amplitude of peroneal and sural nerves and of sensory fibers in at least 1 nerve in upper limbs; additionally, the reduction of motor potential amplitude in peroneal, tibial as well as median or ulnar nerves must be observed
Grade V (extremal)	no response from sensory and motor fibers in lower limbs and in sensory fibers in upper limbs; response in motor fibers in upper limbs may be observed

**Fig. 1.** Mean amplitude of sensory action potential in investigated and control groups [µV]

The mean amplitude of motor action potentials in the investigated group was statistically significantly lower in comparison to controls. The most significant reduction of amplitude in the investigated group compared to controls was observed in the peroneal nerve (45%, $p < 0.05$ using the Mann–Whitney U test). Moreover, the values of motor action potential amplitudes for tibial, peroneal, median, and ulnar nerve impairments are presented in Table 2.

Mean conduction velocity of sensory action potentials in the investigated group was statistically significantly lower in comparison to controls. The most significant reduction of conduction velocity in the investigated group compared to controls was observed in the median nerve

(19.6%, $p < 0.05$, Mann–Whitney U test). Moreover, the values of sensory action potential conduction velocities for sural, peroneal, median, and ulnar nerve impairments are presented in Table 3.

The mean conduction velocity of motor action potentials was statistically significantly lower in the investigated group when compared to controls. The most significant reduction of conduction velocity in the investigated group compared to controls was observed in the median (12.38%) and peroneal (12.17%) nerves ($p < 0.05$, Mann–Whitney U test). Values for tibial, peroneal, median, and ulnar nerve impairments are presented in Table 4.

The mean distal latency of motor action potentials in the investigated group was statistically significantly lower in comparison to controls. The most significant reduction of distal latency in the investigated group compared to controls was observed in the median nerve (24.1%, $p < 0.05$, Mann–Whitney U test; data not shown).

The mean F wave latency of motor action potentials in the investigated group was statistically significantly longer in comparison to controls. The most significant reduction of F wave latency in the investigated group compared to controls was observed in the median nerve (13%, $p < 0.05$, Mann–Whitney U test; data not shown).

In the present study, the biggest difference in conduction parameters between the examined nerves in the investigated group was observed in the amplitude of both motor and sensory action potentials. The most sensitive parameter of the severity of peripheral nerve impairments was the reduction of sensory action potential amplitude in the peroneal nerve. Similar observations were made for the amplitude of sensory and motor action potentials in other examined nerves. In the case of the conduction velocity as well as distal and F wave latencies, that connection was not so evident.

Taking those data into consideration, we have created a simple scoring system presented in Table 5. We propose the working name “SAP (sensory amplitude potential) – reduction scale” for this scoring scale with stratification of severity.

Discussion

The evaluation of severity of neuropathy remains a challenge for modern medicine.⁴² Many scales have been proposed to resolve this problem, but each of them has its limitations. In many cases, a relationship between a patient's clinical status and NCS results does not exist. Severely disabled patients with neuropathies can have mild NCS results, and the converse relationship is also often observed. Moreover, the ideal scoring system should reflect the natural disease course and include only objective parameters. Distal symmetrical polyneuropathy is the most common polyneuropathy among patients with diabetes mellitus. Electromyography plays an important role in the diagnosis

and disease progression monitoring, especially in patients in the initial phases of neuropathy when symptoms can be subtle.^{43–45} Moreover, clinical evaluation of disease progression can also be subjective and new objective and more precise methods should be evaluated. Our study is an attempt to create a simple scoring system based on electro-neurography criteria that could improve the standards of medical care and positively impact the cooperation between electromyography administrators and neurologists, as well as other specialists such as cardiologists, nephrologists and rehabilitation therapists.

Many screening instruments with numerous composite scores are used to evaluate the severity of neuropathy. One of the most frequently used systems of classification is Neuropathy Disability Score (NDS) that examines temperature, vibration perception and presence of reflexes.^{46,47} Another scale is the Neuropathy Impairment Score (NIS) which includes the examination of sensory functions and reflexes but also the evaluation of motor function impairments.^{48,49} Disease symptoms, reflexes and sensory symptoms are found in the Toronto Clinical Neuropathy Scoring System.^{50,51} Using the systems of classification presented above allows physicians to assign patients to different disease levels; however, it is important to notice that the clinical features of one patient may not be directly comparable to those of another one, even if the same degree of neuropathy has been established in both cases. The explanation of this observation derives from the fact that symptoms of neuropathy may vary from patient to patient. Foot deformities are often seen in neuropathies, especially hereditary ones. Additionally, asymmetric motor and sensory symptoms can make the evaluation more difficult.^{52,53} Many scores were developed for screening for a particular type of neuropathy or to evaluate disease severity. For example, the Michigan Neuropathy Screening Instrument questionnaire (MNSIq) contains symptoms, sensory disturbances and reflex disturbances, and is used in screening for diabetic neuropathy, similar to the Clinical Neuropathy Examination (CNE).^{54–56} The indubitable advantage of those scales is that they do not require specific knowledge or appropriate professional training, and can be performed by clinicians other than neurologists. Unfortunately, they also include some criteria that can make the objective assessment of disease progression difficult.

In the present study, among all the parameters evaluated in the NCS, the most significant reduction was observed in the case of sensory and motor action potential amplitudes. It confirms the hypothesis that in cases of DSPN, axonal loss plays an important role in the pathogenesis of the disease. Features of the demyelinating process were also observed in these patients, but they were far less increased. Due to that, conduction velocity and distal and F wave latencies, which are the parameters of demyelination, were not reduced as much as the amplitude of motor and sensory action potentials. The presented results also confirm the hypothesis that sensory nerves are more

affected by the disease than motor nerves. In our study, the most sensitive parameter of peripheral nerve impairment severity was the reduction of sensory action potential amplitude in the peroneal nerve. It seems that the reduction of sensory action potential amplitude in this nerve is the first sign of disease. Patients with diabetes and isolated impairment of peroneal nerve sensory fibers should be monitored for DSPN. Symptoms of DSPN usually start in the lower limbs and sensory fibers. In our study, the most significant reduction was observed in both the amplitude of sensory action potentials and conduction velocities. The presented scale seems to reflect the nature of the disease with the proposed sensory nerve evaluation. Our scoring system may be very useful not only for neurologists but also for diabetologists. Electromyography studies are safe for the patient and can be performed in every hospital.

Limitations

The limitation of our study is that the correlation between our scoring system and classifications was based on clinical criteria that were not evaluated. The next step of our investigations will be the assessment of this classification system in different types of neuropathies.

Conclusions

Proper polyneuropathy systems of classification seem to be inevitable in routine neurological practice. Not only could they improve the organization of medical research, but also they could help monitor disease progression and treatment effects. The majority of scores involve sensory perception, motor functions, reflexes, and disease symptoms. If the scale is too subtle or does not reflect the severity of the disease, the symptomatology alone is insufficient. Electroneurographic studies have a high sensitivity in the diagnosis of polyneuropathy, as well as play a big role in the evaluation of disease progression. Although numerous, the attempts of creating new scores have failed to be widely used in clinical practice. The presented classification is a simple and objective scoring system based only on electroneurographic parameters and can be used in patients with DSPN who have experienced disease progression. In our study, the most significant reductions were in the amplitude of sensory action potentials. This finding is connected to axonal degeneration and Schwann cell damage that were observed during nerve biopsies in patients with diabetes mellitus polyneuropathy in previous studies.^{57–60} There is a strong correlation between electroneurographic results and histopathological findings; thus, a scoring system based on electroneurographic criteria reflects the natural disease course. The presented paper is a pilot study, and further studies evaluating the correlation between our classification and those based on clinical criteria are in progress.

ORCID iDs

Jakub Stepień  <https://orcid.org/0000-0001-5789-8518>
Zanna Pastuszak  <https://orcid.org/0000-0002-1806-1587>

References

1. Snyder MJ, Gibbs LM, Lindsay TJ. Treating painful diabetic peripheral neuropathy: An update. *Am Fam Physician*. 2016;94(3):227–234. PMID:27479625.
2. Hicks CW, Selvin E. Epidemiology of peripheral neuropathy and lower extremity disease in diabetes. *Curr Diab Rep*. 2019;19(10):86. doi:10.1007/s11892-019-1212-8
3. Hammi C, Yeung B. Neuropathy. In: *StatPearls*. Treasure Island, USA: StatPearls Publishing; 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542220/>. Accessed October 15, 2022.
4. Papanas N, Ziegler D. Risk factors and comorbidities in diabetic neuropathy: An update 2015. *Rev Diabet Stud*. 2015;12(1–2):48–62. doi:10.1900/RDS.2015.12.48
5. Kaku M, Vinik A, Simpson DM. Pathways in the diagnosis and management of diabetic polyneuropathy. *Curr Diab Rep*. 2015;15(6):609. doi:10.1007/s11892-015-0609-2
6. Boulton AJM, Kempler P, Ametov A, Ziegler D. Whither pathogenetic treatments for diabetic polyneuropathy? *Diabetes Metab Res Rev*. 2013;29(5):327–333. doi:10.1002/dmrr.2397
7. Liu S, Kuja-Halkola R, Larsson H, et al. Poor glycaemic control is associated with increased risk of neurodevelopmental disorders in childhood-onset type 1 diabetes: A population-based cohort study. *Diabetologia*. 2021;64(4):767–777. doi:10.1007/s00125-020-05372-5
8. Archer AG, Watkins PJ, Thomas PK, Sharma AK, Payan J. The natural history of acute painful neuropathy in diabetes mellitus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1983;46(6):491–499. doi:10.1136/jnnp.46.6.491
9. Brill V, Perkins BA. Validation of the Toronto Clinical Scoring System for diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care*. 2002;25(11):2048–2052. doi:10.2337/diacare.25.11.2048
10. Goel J, Anadure RK, Nair MD, Nair S, Yasha TC. A study correlating nerve biopsy with clinical diagnosis and its impact on improving management in peripheral neuropathies. *Interdiscip Neurosurg*. 2021;25:101237. doi:10.1016/j.inat.2021.101237
11. McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: Normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol*. 1998;55(12):1513–1520. doi:10.1001/archneur.55.12.1513
12. Lehmann HC, Wunderlich G, Fink GR, Sommer C. Diagnosis of peripheral neuropathy. *Neurol Res Pract*. 2020;2:20. doi:10.1186/s42466-020-00064-2
13. Yu Y. Gold standard for diagnosis of DPN. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:719356. doi:10.3389/fendo.2021.719356
14. Bryleva EY, Brundin L. Suicidality and activation of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. In: *Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications*. Vol 31. Current Topics in Behavioral Neurosciences. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2016:269–284. doi:10.1007/7854_2016_5
15. Sharma KR, Cross J, Farronay O, Ayyar D, Shebert R, Bradley W. Demyelinating neuropathy in diabetes mellitus. *Arch Neurol*. 2002;59(5):758–765. doi:10.1001/archneur.59.5.758
16. Fatehi F, Nafissi S, Basiri K, Amiri M, Soltanzadeh A. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with diabetes mellitus. *J Res Med Sci*. 2013;18(5):438–441. PMID:24174953.
17. Igelhorst BA, Niederkinkhaus V, Karus C, Lange MD, Dietzel ID. Regulation of neuronal excitability by release of proteins from glial cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370(1672):20140194. doi:10.1098/rstb.2014.0194
18. Yang Z, Chen R, Zhang Y, et al. Scoring systems to screen for diabetic peripheral neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2018(7):CD010974. doi:10.1002/14651858.CD010974.pub2
19. Carmichael J, Fadavi H, Ishibashi F, Shore AC, Tavakoli M. Advances in screening, early diagnosis and accurate staging of diabetic neuropathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:671257. doi:10.3389/fendo.2021.671257
20. Koop L, Tadi P. Neuroanatomy, sensory nerves. In: *StatPearls*. Treasure Island, USA: StatPearls Publishing; 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539846/>. Accessed July 25, 2022.

21. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, et al. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):42. doi:10.1038/s41572-019-0097-9
22. Peltier AC, Myers MI, Artibee KJ, et al. Evaluation of dermal myelinated nerve fibers in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst*. 2013;18(2):162–167. doi:10.1111/jnps.12027
23. Jin HY, Park TS. Can nerve conduction studies detect earlier and predict clinical diabetic neuropathy? *J Diabetes Invest*. 2015;6(1):18–20. doi:10.1111/jdi.12236
24. Behse F, Buchthal F. Normal sensory conduction in the nerves of the leg in man. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1971;34(4):404–414. doi:10.1136/jnnp.34.4.404
25. Ghiasvand F, Ghadimi M, Ghadimi F, Safarpour S, Hosseinzadeh R, SeyedAlinaghi S. Symmetrical polyneuropathy in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *IDCases*. 2020;21:e00815. doi:10.1016/j.idcr.2020.e00815
26. Rutkove SB. Effects of temperature on neuromuscular electrophysiology. *Muscle Nerve*. 2001;24(7):867–882. doi:10.1002/mus.1084
27. Hange N, Poudel S, Ozair S, et al. Managing chronic neuropathic pain: Recent advances and new challenges. *Neurol Res Int*. 2022;2022:8336561. doi:10.1155/2022/8336561
28. Burgess J, Frank B, Marshall A, et al. Early detection of diabetic peripheral neuropathy: A focus on small nerve fibres. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(2):165. doi:10.3390/diagnostics11020165
29. Dunker Ø, Nilsen KB, Olsen SE, Åsvold BO, Bjørngaas MRR, Sand T. Which combined nerve conduction study scores are best suited for polyneuropathy in diabetic patients? *Muscle Nerve*. 2022;65(2):171–179. doi:10.1002/mus.27445
30. Petropoulos IN, Ponirakis G, Khan A, Almuhammad H, Gad H, Malik RA. Diagnosing diabetic neuropathy: Something old, something new. *Diabetes Metab J*. 2018;42(4):255–269. doi:10.4093/dmj.2018.0056
31. Service FJ, Rizza RA, Daube JR, O'Brien PC, Dyck PJ. Near normoglycaemia improved nerve conduction and vibration sensation in diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 1985;28(10):722–727. doi:10.1007/BF00265018
32. Yang Z, Zhang Y, Chen R, et al. Simple tests to screen for diabetic peripheral neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2018(7):CD010975. doi:10.1002/14651858.CD010975.pub2
33. Dyck PJ, Davies JL, Litchy WJ, O'Brien PC. Longitudinal assessment of diabetic polyneuropathy using a composite score in the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. *Neurology*. 1997;49(1):229–239. doi:10.1212/WNL.49.1.229
34. Dyck PJ, Kincaid JC, Dyck PJB, et al. Assessing mNIS+7lonis and international neurologists' proficiency in a familial amyloidotic polyneuropathy trial. *Muscle Nerve*. 2017;56(5):901–911. doi:10.1002/mus.25563
35. Vas PR, Sharma S, Rayman G. Distal sensorimotor neuropathy: Improvements in diagnosis. *Rev Diabet Stud*. 2015;12(1–2):29–47. doi:10.1900/RDS.2015.12.29
36. Abraham A, Barnett C, Katzberg HD, Lovblom LE, Perkins BA, Brill V. Toronto Clinical Neuropathy Score is valid for a wide spectrum of polyneuropathies. *Eur J Neurol*. 2018;25(3):484–490. doi:10.1111/ene.13533
37. Picon AP, Ortega NRS, Watari R, Sartor C, Sacco ICN. Classification of the severity of diabetic neuropathy: A new approach taking uncertainties into account using fuzzy logic. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(2):151–156. doi:10.6061/clinics/2012(02)10
38. Baets J, Deconinck T, De Vriendt E, et al. Genetic spectrum of hereditary neuropathies with onset in the first year of life. *Brain*. 2011;134(Pt 9):2664–2676. doi:10.1093/brain/awr184
39. Valk GD, De Sonnaville JJ, Van Houtum WH, et al. The assessment of diabetic polyneuropathy in daily clinical practice: Reproducibility and validity of Semmes Weinstein monofilaments examination and clinical neurological examination. *Muscle Nerve*. 1997;20(1):116–118. doi:10.1002/(SICI)1097-4598(199701)20:1<116::AID-MUS19>3.0.CO;2-2
40. Van De Poll-Franse LV, Valk GD, Renders CM, Heine RJ, Van Eijk JTM. Longitudinal assessment of the development of diabetic polyneuropathy and associated risk factors. *Diabet Med*. 2002;19(9):771–776. doi:10.1046/j.1464-5491.2002.00778.x
41. Herman WH, Pop-Busui R, Braffett BH, et al. Use of the Michigan Neuropathy Screening Instrument as a measure of distal symmetrical peripheral neuropathy in type 1 diabetes: Results from the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications. *Diabet Med*. 2012;29(7):937–944. doi:10.1111/j.1464-5491.2012.03644.x
42. Tanaka M, Szabó Á, Spekker E, Polyák H, Tóth F, Vécsei L. Mitochondrial impairment: A common motif in neuropsychiatric presentation? The link to the tryptophan–kynurenine metabolic system. *Cells*. 2022;11(16):2607. doi:10.3390/cells11162607
43. Zheng H, Sun W, Zhang Q, et al. Proinflammatory cytokines predict the incidence of diabetic peripheral neuropathy over 5 years in Chinese type 2 diabetes patients: A prospective cohort study. *EclinicalMedicine*. 2020;31:100649. doi:10.1016/j.eclinm.2020.100649
44. Skundric DS, Lisak RP. Role of neurotrophic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy: From glucose metabolism to neurodegeneration. *Exp Diabet Res*. 2003;4(4):303–312. doi:10.1155/EDR.2003.303
45. Behse F, Buchthal F, Carlsen F. Nerve biopsy and conduction studies in diabetic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1977;40(11):1072–1082. doi:10.1136/jnnp.40.11.1072
46. Younger DS. Diabetic neuropathy: A clinical and neuropathological study of 107 patients. *Neurol Res Int*. 2010;2010:140379. doi:10.1155/2010/140379
47. Dyck PJB, Engelstad J, Norell J, Dyck PJ. Microvasculitis in non-diabetic lumbosacral radiculoplexus neuropathy (LSRPN): Similarity to the diabetic variety (DLSRPN). *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(6):525–538. doi:10.1093/jnen/59.6.525
48. Woltman H, Wilder R. Diabetes mellitus: Pathogenic changes in the spinal cord and peripheral nerves. *Arch Intern Med (Chic)*. 1929;44:576–603. doi:10.1001/archinte.1929.00140040114010
49. Krendel DA, Costigan DA, Hopkins LC. Successful treatment of neuropathies in patients with diabetes mellitus. *Arch Neurol*. 1995;52(11):1053–1061. doi:10.1001/archneur.1995.00540350039015
50. Younger DS, Rosoklija G, Hays AP, Trojaborg W, Latov N. Diabetic peripheral neuropathy: A clinicopathologic and immunohistochemical analysis of sural nerve biopsies. *Muscle Nerve*. 1996;19(6):722–727. doi:10.1002/(SICI)1097-4598(199606)19:6<722::AID-MUS6>3.0.CO;2-C
51. Ciapała K, Mika J, Rojewska E. The kynurenine pathway as a potential target for neuropathic pain therapy design: From basic research to clinical perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021;22(20):11055. doi:10.3390/ijms222011055
52. Tajti J, Szok D, Csáti A, Szabó Á, Tanaka M, Vécsei L. Exploring novel therapeutic targets in the common pathogenic factors in migraine and neuropathic pain. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):4114. doi:10.3390/ijms24044114
53. Perini F, D'Andrea G, Galloni E, et al. Plasma cytokine levels in migraineurs and controls. *Headache*. 2005;45(7):926–931. doi:10.1111/j.1526-4610.2005.05135.x
54. Baka P, Escolano-Lozano F, Birklein F. Systemic inflammatory biomarkers in painful diabetic neuropathy. *J Diabetes Complications*. 2021;35(10):108017. doi:10.1016/j.jdiacomp.2021.108017
55. Zilliox LA, Ruby SK, Singh S, Zhan M, Russell JW. Clinical neuropathy scales in neuropathy associated with impaired glucose tolerance. *J Diabetes Complications*. 2015;29(3):372–377. doi:10.1016/j.jdiacomp.2015.01.011
56. Badawy AAB. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *Int J Tryptophan Res*. 2017;10:117864691769193. doi:10.1177/1178646917691938
57. Tanaka M, Török N, Tóth F, Szabó Á, Vécsei L. Co-players in chronic pain: Neuroinflammation and the tryptophan-kynurenine metabolic pathway. *Biomedicines*. 2021;9(8):897. doi:10.3390/biomedicines9080897
58. Meacham K, Shepherd A, Mohapatra DP, Haroutounian S. Neuropathic pain: Central vs. peripheral mechanisms. *Curr Pain Headache Rep*. 2017;21(6):28. doi:10.1007/s11916-017-0629-5
59. Savitz J. The kynurenine pathway: A finger in every pie. *Mol Psychiatry*. 2020;25(1):131–147. doi:10.1038/s41380-019-0414-4
60. Rojewska E, Piotrowska A, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. *Neuropharmacology*. 2016;102:80–91. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.040

RESEARCH ARTICLE

Neuroscience of Disease

Electroneurological changes in peripheral nerves in patients post-COVID

Jakub Stepien^{1,3} and Żanna Pastuszek^{2,3}

¹Insula Clinical Trials Center, Warsaw, Poland; ²Laboratory of Experimental and Clinical Neurosurgery, Mossakowski Medical Research Institute Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland; and ³Department of Neurosurgery, Bielski Hospital, Warsaw, Poland

Abstract

Various neurological manifestations are observed in about 36.4% of patients infected with SARS-CoV-2 and post-COVID neuropathy is one of them. There is lack of studies describing neurophysiological abnormalities in peripheral nerves in case of patients who had SARS-CoV-2 infection. The aim of this study was to analyze the changes in peripheral nervous system in case of COVID-19 survivors. In the presented study, 45 COVID-19 survivors who had nerve conduction study (NCS) were involved. Results were compared with control group consisting of healthy patients who had nerve conduction study before the COVID-19 pandemic. In our study group, neurophysiological abnormalities were present in the case of both sensory and motor nerve fibers. The most significant reduction of NCS parameters was observed in the case of sensory action potential amplitude of sural nerve. Moreover, that correlation was the most significant in the case of amplitude and conduction velocity in sensory and motor neuron fibers both in arms and legs. Those abnormalities were observed even 6 mo after COVID-19. Further investigation needs to be done regarding the polyneuropathies associated with human coronaviruses, and we should answer the question whether the virus directly damages peripheral nerves or factors mediating inflammatory response are responsible for the neural damage.

NEW & NOTEWORTHY Various neurological manifestations are observed in about 36.4% of patients infected with SARS-CoV-2 and post-COVID neuropathy is one of them. There is lack of studies describing neurophysiological abnormalities in peripheral nerves in case of patients who had SARS-CoV-2 infection. The aim of this study was to analyze changes in peripheral nervous system in case of COVID-19 survivors.

coronavirus; electroneurography; nerve conduction study; neuropathy; post-COVID-19 neuropathy

INTRODUCTION

The predominant clinical presentation COVID-19 infection is a respiratory disease with the most common complications including pneumonia and acute respiratory distress syndrome. Few studies have shown that also central nervous system (CNS) and peripheral nervous system disease caused by SARS-CoV-2 might be more frequent than we thought before. In another study, the most common neurological symptoms reported in patients with COVID-19 were headache (6%), vertigo (3.4%), paresthesia (3.1%), altered consciousness (2%), hyposmia/anosmia (1.4%), and encephalitis (0.9%), cerebrovascular events (0.6%), seizure (0.3%), Guillain-Barré syndrome (GBS) (0.3%), and several case reports of Miller Fisher syndrome and other neuropathies (1). Rhabdomyolysis, myopathy, myositis, myasthenia, myasthenic syndrome as well as

polyradiculitis may also be connected to SARS-CoV-2 infection but their incidence remains unknown (2). Although various neurological manifestations are observed in ~36.4% of patients infected with SARS-Cov-2, the incidence of post-COVID neuropathy remains unknown (3). In another study, peripheral neuropathy was observed in less than 1% of patients with COVID-19 (4). Risk factors for neuropathy identified were diabetes, obesity, drug use, and prolonged stay in the intensive care unit (2). One of the most important goal of that study was to differentiate patients with critical illness polyneuropathy and myopathy (CIAW) from post-COVID neuropathy. CIAW is a neuromuscular disorder that may develop in patients with severe disease often resulting in admission to an intensive care unit. COVID-19 infection is a risk factor of CIAW and in case of patients with severe course of COVID-19 it may be difficult to differentiate post-COVID neuropathy from CIAW (5).



Correspondence: J. Stepien (jakub.stepien@o2.pl).

Submitted 19 September 2022 / Revised 7 December 2022 / Accepted 7 December 2022

392

0022-3077/23 Copyright © 2023 The Authors. Licensed under Creative Commons Attribution CC-BY 4.0.

Downloaded from journals.physiology.org/journal/jn (188.146.116.219) on December 12, 2023.



www.jn.org

Table 1. A comparison of the ages of the study group with the control group

	Group	n	M	SD	Med	Min.	Max.
Age	Study	45	54.4	11.4	55	22	69
	Control	45	52.6	21.8	54	23	87

M, mean age; Med, median age; Min., minimum age; Max, maximum age; n, number of patients; SD, standard deviation.

Etiopathogenesis of peripheral neuropathy in patients with post-COVID is unknown. Molecular mimicry, which is an important mechanism in creating autoimmune disorders, may have a role in the development of COVID-19-associated polyneuropathy. Moreover, in COVID-19 hyperinflammation and immune system dysregulation are observed and can be also responsible for peripheral nerves damage. Some evidence suggests that hyperinflammation in case of patients with COVID-19 is associated with increased interleukin (IL)-2, IL-7, granulocyte-colony stimulating factor, interferon- γ inducible protein 10, monocyte chemoattractant protein 1, macrophage inflammatory protein 1- α , and tumor necrosis factor- α . All mentioned cytokines are connected to severe disease course and are predictors of fatality rate (6–8).

CLINICAL RATIONALE FOR THE STUDY

There is a lack of studies describing neurological complications in COVID-19 survivors that were made on bigger groups of patients with the use of nerve conduction study (NCS). Moreover, there is a need to explore the abnormalities in nerve conduction study (NCS) in patients with post-COVID-19 neuropathies. The aim of this study was to analyze changes in peripheral nervous system in case of COVID-19 survivors with neuropathy symptoms.

MATERIALS AND METHODS

The study group consisted of 45 patients (M20, W25). The mean age in study group was 54.4 yr. The control group consisted of 45 patients (M11, W34). The mean age in the control group was 52.6 yr (Table 1).

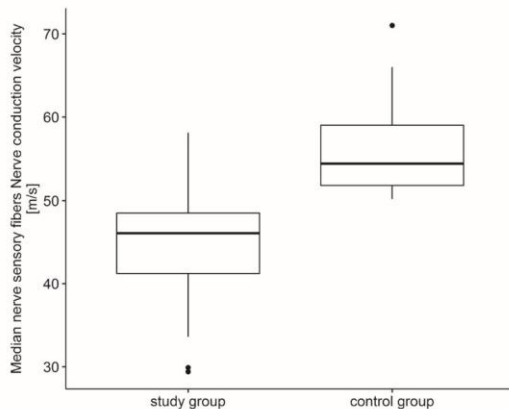


Figure 1. Median nerve sensory fibers. Nerve conduction velocity (m/s).

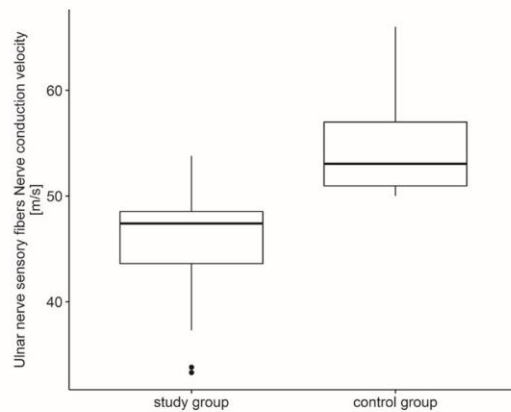


Figure 2. Ulnar nerve sensory fibers. Nerve conduction velocity (m/s).

The study group patients who survived COVID-19 in maximal time of 6 mo before NCS study were included. All those patients were referred to our center for evaluation of neurological symptoms of post-COVID infection. All investigated patients reported lower limbs paresthesia and 17 patients had upper limb paresthesia. Sensory peripheral nerve symptoms were present in case of 11 patients and muscle weakness that started after COVID-19 infection was present in case of three patients. COVID-19 infection was confirmed with the use of PCR test. The study group patients with mild to moderate SARS-Cov-2 infection were included. All patients had respiratory tract infection with the symptoms like fever, cough, sore throat, general weakness, and muscle pain. Patients with severe disease course who were hospitalized in intensive care unit were excluded from the study. In this group of people, peripheral nerve damage could be connected to the presence of CIAW or to prone position during respiratory therapy. All patients fulfilled the criteria of the long-COVID according to NICE (9, 10). Patients treated with

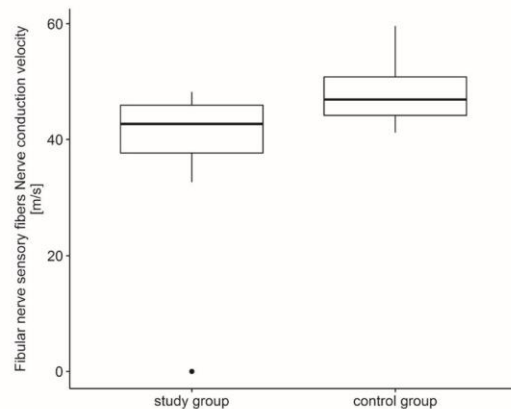


Figure 3. Fibular nerve sensory fibers. Nerve conduction velocity (m/s).

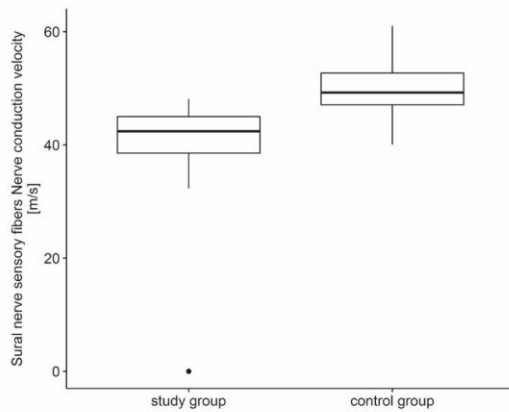


Figure 4. Sural nerve sensory fibers. Nerve conduction velocity (m/s).

neurotoxic drugs such as daptomycin, linezolid, lopinavir, ritonavir, hydro-chloroquine, cisatracurium, clindamycin, and glucocorticoids were also excluded from the study due to the possibility of inducing toxic neuropathy. Patients treated with neurotoxic drugs as well as patients with other diseases that could be connected to polyneuropathy such as diabetes,

vitamin B12 deficiency, or alcohol abuse were excluded from the study. Patients were asked by the doctor about their medical history and actual symptoms to exclude diseases that could cause polyneuropathy. Patients were kept under medical supervision by GP doctors and had periodical laboratory tests. Patients were excluded from the study in case of abnormal findings on examination of blood that could be connected to polyneuropathy.

Patients in the study group did not have any signs and symptoms of peripheral nerve damage before SARS-CoV 2 infection.

Control group consisted of healthy volunteers who did not have symptoms of any neurologic disorder and abnormalities during neurological examination. Patients had nerve conduction study since 2014 to 2018 when SARS-CoV-2 infection wasn't present in the population. Those people participated in study where nerve conduction study was evaluated in patients with multiple sclerosis and results were compared with control group consisted of healthy volunteers. Patients in control group were age-matched and sex-matched for patients in the investigated group. Patients with any abnormalities in the neurological examination as well as patients diagnosed with any disorder or taking any drugs were excluded from the study.

Bioethics committee and regulatory approval were obtained before the study was started and in case of all patients the written informed consent was taken.

Table 2. Basic descriptive statistics for the nerves of the upper extremities

	Group	n	M	SD	Me	IQR	P Value
Median nerve sensory fibers response amplitude, μV	Study group	45	12.37	8.204			<0.001
	Control group	45	30.09	18.235			
Median nerve sensory fibers nerve conduction velocity, ms	Study group	45	44.62	6.213			<0.001
	Control group	45	56.03	5.011			
Median nerve motor fibers distal latency (between APB and wrist), ms	Study group	45			3.87	0.750	<0.001
	Control group	44			3.43	0.428	
Median nerve motor fibers response amplitude (between APB and wrist), mV	Study group	45			6.80	3.800	0.007
	Control group	44			8.25	3.900	
Median nerve motor fibers nerve conduction velocity (between APB and wrist), ms	Study group	45	53.75	3.936			<0.001
	Control group	44	59.13	4.141			
Median nerve motor fibers F wave latency, ms	Study group	45	27.77	2.401			<0.001
	Control group	44	25.92	2.202			
Ulnar nerve sensory fibers response amplitude, μ V	Study group	45			12.90	6.500	<0.001
	Control group	41			25.00	28.400	
Ulnar nerve sensory fibers nerve conduction velocity, ms	Study group	45	46.07	4.440			<0.001
	Control group	41	54.58	4.187			
Ulnar nerve motor fibers distal latency (between ADM and wrist), ms	Study group	45			3.15	0.470	0.002
	Control group	41			2.80	0.370	
Ulnar nerve motor fibers response amplitude (between ADM and wrist), mV	Study group	45			8.90	2.600	0.009
	Control group	41			10.20	2.400	
Ulnar nerve motor fibers nerve conduction velocity (between ADM and wrist), ms	Study group	45			54.20	3.300	<0.001
	Control group	41			60.00	8.000	
Ulnar nerve motor fibers F wave latency, ms	Study group	45	28.07	2.752			0.015
	Control group	41	26.32	2.410			

Bold text—normal distribution (rest—nonnormal distribution). APB, abductor pollicis brevis; ADM, adductor digiti minimi; IQR, interquartile range; M, mean; Me, median; n, number of valid observations; SD, standard deviation.

All patients in the investigated and control group had NCS. Both sensory and motor fibers of right median, ulnar, fibular as well as sural nerve were investigated with the use of NCS. Motor and sensory nerve conduction study was performed in an environment with temperature ranging between 21 and 25°C. Amplitude, conduction velocity as well as distal latency and F-wave latency were examined and compared with results in control group with the use of Mann–Whitney test (11). Sensory studies were performed antidromically. In the case of median nerve sensory action potential, the recording electrode was placed on the second finger while in case of ulnar nerve it was placed on the fifth finger. The sural nerve was stimulated on the posterolateral aspect of the lower third of the leg and the distance between the recording electrode and the stimulating one was ~14 cm. Sensory nerve action potential amplitudes were measured baseline-to-peak. In case of median nerve motor fibers, the recording electrode was placed over the abductor pollicis brevis muscle whereas in the case of ulnar nerve it was placed over the adductor digiti minimi muscle. In case of fibular nerve, the recording electrode was placed over the extensor digitorum brevis whereas the abductor hallucis muscle was the placement of recording electrode in case of tibial nerve. The distance between the recording electrode and place of stimulation was 8 cm. Locations of stimulating and recording electrodes in case of all examined nerves were typical as presented in those studies (12, 13).

RESULTS

Median Nerve

The median sensory nerve action potential amplitude in patients with COVID-19 was lower compared with the control group ($U = 332.5, P < 0.001$). Conduction velocity in sensory fibers of median nerve was also lower compared with control group ($U = 75.5, P < 0.001$) (Fig. 1). In case of median nerve motor fibers, in study group action potential amplitude was statistically lower than that in the control group as well as the conduction velocity ($U = 659.5, P = 0.007$). The same situation was in the case of distal latency ($U = 321.5, P < 0.001$) as well as F-wave latency that were statistically higher compared with control group ($U = 575.0, P < 0.001$). The strongest correlation was in the case of nerve conduction velocity reduction in the study group compared with other nerve conduction study parameters (amplitude, distal latency, and F-wave latency) ($r = 0.93$).

Ulnar Nerve

Statistical analysis revealed that sensory nerve action potential amplitude of ulnar nerve in patients with COVID-19 was lower compared with controls ($U = 383.0, P < 0.001$). Conduction velocity in sensory fibers of ulnar nerve was also lower compared with control group ($U = 80.5, P < 0.001$) (Fig. 2). In case of motor fibers of ulnar nerve in the study group, action potential amplitude was statistically lower than that in the control group ($U = 621.5,$

Table 3. Basic descriptive statistics for the nerves of the lower extremities

	Group	n	M	SD	Me	IQR	P Value
Fibular nerve sensory fibers response amplitude, μ V	Study group	45			4.60	2.000	<0.001
	Control group	45			8.20	3.700	
Fibular nerve sensory fibers nerve conduction velocity, m/s	Study group	45			42.50	8.100	<0.001
	Control group	45			48.00	7.100	
Fibular nerve motor fibers distal latency (between EDB and ankle), ms	Study group	45			4.29	0.700	0.023
	Control group	45			3.83	0.840	
Fibular nerve motor fibers action potential amplitude (between EDB and ankle), mV	Study group	45	3.37	2.139			<0.001
	Control group	45	5.54	2.151			
Fibular nerve motor fibers nerve conduction velocity (between EDB and ankle), ms	Study group	45			41.90	6.200	<0.001
	Control group	45			48.00	6.000	
Fibular nerve motor fibers F wave latency, ms	Study group	45			50.50	5.700	0.003
	Control group	45			47.00	5.300	
Sural nerve sensory fibers response amplitude, μ V	Study group	44			4.95	2.250	<0.001
	Control group	44			12.15	7.125	
Sural nerve sensory fibers nerve conduction velocity, ms	Study group	44			42.40	6.450	<0.001
	Control group	43			49.50	7.250	
Tibial nerve motor fibers distal latency (between AHM and ankle joint), ms	Study group	44			3.61	1.047	0.634
	Control group	45			3.61	0.930	
Tibial nerve motor fibers action potential amplitude (between AHM and ankle joint), mV	Study group	44			10.00	7.000	<0.001
	Control group	45			13	7.000	
Tibial nerve motor fibers nerve conduction velocity (between AHM and ankle joint), ms	Study group	44			41.00	5.000	<0.001
	Control group	45			47	4.000	
Tibial nerve motor fibers F wave latency, ms	Study group	44			51.00	6.000	<0.001
	Control group	45			47	5.000	

Bold text—normal distribution (rest—nonnormal distribution). AHM, abductor hallucis muscle; EDB, extensor digitorum brevis; IQR, interquartile range; M, mean; Me, median; n, number of valid observations; SD, standard deviation.

$P = 0.009$) as well as the conduction velocity ($U = 263.5$, $P < 0.001$). The same situation was in the case of distal latency ($U = 572.0$, $P = 0.002$) as well as F-wave latency that were statistically higher compared with control group ($U = 642.0$, $P = 0.015$). The strongest correlation was in the case of nerve conduction velocity reduction in the study group compared with controls ($r = 0.91$).

Fibular Nerve

The fibular sensory nerve action potential amplitude in patients with COVID-19 was lower compared with controls ($U = 38.0$, $P < 0.001$). Conduction velocity in sensory fibers of fibular nerve was lower compared with control group ($U = 353.5$, $P < 0.001$) (Fig. 3). In case of motor fibers of fibular nerve in the study group, action potential amplitude was statistically lower than that in the control group ($U = 440.5$, $P < 0.001$) as well as the conduction velocity ($U = 271.0$, $P < 0.001$) as well as the conduction velocity ($U = 271.0$, $P < 0.001$). The same situation was in case of distal latency ($U = 730.5$, $P < 0.023$) as well as F-wave latency that were statistically higher compared with control group ($U = 641.0$, $P = 0.003$). The strongest correlation was in the case of sensory action potential amplitude reduction in the study group compared with controls ($r = 0.96$).

Sural Nerve

Statistical analysis revealed that sensory nerve action potential amplitude in patients with COVID-19 was lower compared with controls ($U = 0.0$, $P < 0.01$). The same situation was in the case of conduction velocity that was lower compared with the control group ($U = 172.0$, $P < 0.01$) (Fig. 4). The strongest correlation was in the case of sensory action potential amplitude reduction in the study group compared with controls ($r = 1.0$).

Tibial Nerve

The motor nerve action potential amplitude of tibial nerve was lower in patients with COVID-19 compared with controls ($U = 532.5$, $P < 0.001$). Conduction velocity in motor fibers of tibial nerve was also lower compared with control group ($U = 353.5$, $P < 0.001$). In the case of motor fibers of tibial nerve in the study group, action potential amplitude was statistically lower than that in the control group ($U = 440.5$, $P < 0.001$) as well as conduction velocity ($U = 209.5$, $P < 0.001$). The same situation was in the case of F-wave latency that was statistically higher than that in the control group ($U = 577.0$, $P = 0.001$). The strongest correlation was in the case of nerve conduction velocity reduction in the study group compared with controls ($r = 0.79$). The values of NCS parameters in study and control group are presented in Tables 2 and 3.

In the study group in neurological examination, decreased deep tendon reflexes were the most frequent abnormality. Sensory loss or limb weakness was more rare.

Sample NCS result is presented in Fig. 5.

DISCUSSION

In the presented study, we analyzed nerve conduction study of patients who had polyneuropathy symptoms that started during COVID infection or to 6 mo after COVID-19 infection (in case of majority of them symptoms started during

Right Medianus Sensory			
	Peak Lat	Amp	CV
	ms	uV	m/s
Wrist - Dig II	5.14	2.7	35.3

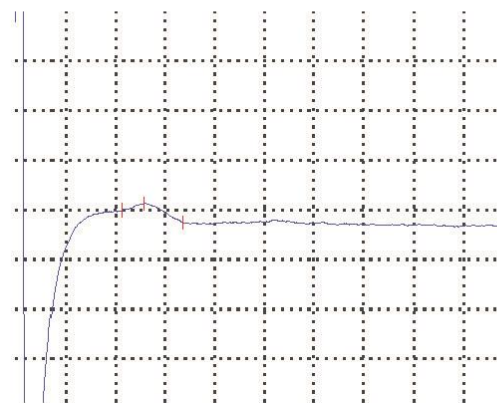


Figure 5. Sample nerve conduction study (NCS) result—right medianus. Amp, amplitude; CV, conduction velocity; Dig II, digit II; Peak Lat, peak latency.

first few weeks since COVID-19 diagnosis was made). In our study, there was statistically significant reduction of amplitude and conduction velocity in both sensory and motor neuron fibers compared with control group in all examined nerves in upper and lower limbs. Moreover, distal latency and F wave latency was also increased compared with control group. All this abnormalities are typically for polyneuropathy and our results are similar to those described in the literature. The majority of published cases thus far of peripheral nervous disease associated with COVID-19 have shown a symmetrical pattern and it was mixed sensorimotor neuropathy (14–18). In our study group, neurophysiological abnormalities were present in case of both sensory and motor nerves fibers. The most significant reduction of NCS parameters was observed in case of sensory action potential amplitude of sural nerve. Moreover, that correlation was the most significant in case of amplitude and conduction velocity in sensory and motor neuron fibers both in arms and legs. In the study group, NCS showed both axonal loss and demyelinating features in COVID-19 survivors who had the symptoms of polyneuropathy. Primary demyelination can be defined as a process in which there is the destruction of myelin sheaths whereas axons are relatively spared. Secondary demyelination occurs as a consequence of axonal destruction, where the initial event is axonal damage, and myelin degeneration follows degeneration of the axons (19). In the presented study,

electroneurographical parameters have indicated that secondary rather than primary demyelination is connected to post-COVID neuropathy in the study group. In another study it was revealed that among evaluated patients with symptoms of polyneuropathy after COVID-19, the small-fiber neuropathy was the most common type of peripheral nervous system disease. Symptoms were beginning within 1 mo of COVID-19 onset and diagnosis was confirmed with the use of skin biopsy (20). In our study it was obvious that SARS-Cov-2 can impair peripheral nerves fibers resulting in polyneuropathy. Etiopathogenesis of peripheral neuropathy in patients with post-COVID is unknown. Molecular mimicry as well as hyperinflammation and immune system dysregulation can be responsible for peripheral nerves damage in COVID-19 survivors. Some evidence suggests that interleukin (IL)-2, IL-7, granulocyte-colony stimulating factor, interferon- γ , inducible protein 10, monocyte chemoattractant protein 1, macrophage inflammatory protein 1- α , and tumor necrosis factor- α are the most important cytokines connected to peripheral nerves damage (6–8). The exact mechanism of entry into the central nervous system (CNS) is also unknown. Although SARS-Cov-2 may have direct access to the CNS, only two cases have been reported with SARS-Cov-2 in cerebrospinal fluid (1, 2). Currently discussed routes include retrograde neuronal transport across infected neurons, entry via the olfactory nerve, infection of the vascular endothelium, or white blood cell migration across the blood-brain barrier (21–23). Further medical investigation should be done to answer the question if those mechanism present in CNS are connected to peripheral nerves damage. Although the exact mechanism of inducing polyneuropathy in patients with post-COVID remains undiscovered, when evaluating patients with new-onset peripheral neuropathy, screening for recent COVID-19 infection should be done.

It remains unclear which factors are associated with increased risk of neurologic manifestation in case of patients with post-COVID. In another study it was suggested that neurological symptoms are more common in patients with severe disease course (3). Patients with COVID-19 are in risk group of developing CIAW. In case of patients with severe course of COVID-19 who are admitted to intensive care unit, post-COVID neuropathy can coexist with CIAW. Due to that we excluded from the study patients that fulfil the criteria of CIAW (5). Patients treated with neurotoxic drugs such as daptomycin, linezolid, lopinavir, ritonavir, hydro-chloroquine, cisatracurium, clindamycine, and glucocorticoids were also excluded from the study due to the possibility of inducing toxic neuropathy. Patients treated with neurotoxic drugs as well as patients with other disease that could be connected to polyneuropathy like diabetes, vitamin B12 deficiency, or alcohol abuse were excluded from the study. Patients in study group did not have any sign and symptoms of peripheral nerves damage before SARS-CoV 2 infection. Although in our study we have tried to rule out patients with other causes of polyneuropathy, there is need to find clear direct pathophysiological link between COVID-19 infection and neuropathy (e.g., supportive nerve biopsy findings).

In another study it was discovered that zinc deficiency can lead to cytokine production and can increase the risk of polyneuropathy in SARS-CoV-2 infection. It may be a cause of hyperinflammation present in patients with severe

disease course (24). In another study it was revealed that a significant number of patients with COVID-19 were zinc deficient and the deficiency was associated with a prolonged hospital stay and increased mortality. Zinc can regulate leukocyte immune response by alerting cytokine production and has a positive role in inflammatory conditions (25). Possible connection between zinc deficiency and a possible neurotropism of SARS-CoV-2, and the mechanism of COVID-19 related neuropathy need to be fully evaluated.

FUTURE DIRECTIONS

Further investigation, including needle EMG, needs to be done regarding the polyneuropathies associated with human coronaviruses and regarding whether the virus directly damages peripheral nerves or factors mediating inflammatory response are responsible for the neural damage. Awareness of this complication will have an impact on the treatment of patients with neurological complications of SARS-CoV-2.

DATA AVAILABILITY

Data will be made available upon reasonable request.

ACKNOWLEDGMENTS

Graphical Abstract created with BioRender and published with permission.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.S. and Ž.P. conceived and designed research; performed experiments; analyzed data; interpreted results of experiments; prepared figures; drafted manuscript; edited and revised manuscript; approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Chen X, Laurent S, Onur OA, Kleineberg NN, Fink GR, Schweitzer F, Warnke C. A systematic review of neurological symptoms and complications of COVID-19. *J Neurol* 268: 392–402, 2021. doi:10.1007/s00415-020-10067-3.
- Finsterer J, Scorza FA, Scorza CA, Fiorini AC. Peripheral neuropathy in COVID-19 is due to immune-mechanisms, pre-existing risk factors, anti-viral drugs, or bedding in the Intensive Care Unit. *Arg Neuropsiquiatr* 79: 924–928, 2021. doi:10.1590/0004-282X-ANP-2021-0030.
- Bureau BL, Obeidat A, Dhariwal MS, Jha P. Peripheral neuropathy as a complication of SARS-Cov-2. *Cureus* 12: e11452, 2020. doi:10.7759/cureus.11452.
- Romero-Sánchez CM, Díaz-Maroto I, Fernández-Díaz E, Sánchez-Larsen Á, Layos-Romero A, García-García J, González E, Redondo-Peñas I, Perona-Moratalla AB, Del Valle-Pérez JA, Gracia-Gil J, Rojas-Bartolomé L, Ferial-Villar I, Montegudo M, Palao M, Palazón-García E, Alcahut-Rodríguez C, Soplana-Garay D, Moreno Y, Ahmad J, Segura T. Neurologic manifestations in hospitalized patients with COVID-19: the ALBACOVID registry. *Neurology* 95: e1060–e1070, 2020. doi:10.1212/WNL.0000000000009937.
- Cheung K, Rathbone A, Melanson M, Trier J, Ritsma B, Allen M. Pathophysiology and management of critical illness polyneuropathy and myopathy. *J Appl Physiol* 130: 1479–1489, 2021. doi:10.1152/jappphysiol.00019.2021.

6. **Maury A, Lyoubi A, Peiffer-Smadja N, de Broucker T, Meppiel E.** Neurological manifestations associated with SARS-CoV-2 and other coronaviruses: a narrative review for clinicians. *Rev Neurol (Paris)* 177: 51–64, 2021. doi:10.1016/j.neurol.2020.10.001.
7. **Sejvar JJ, Baughman AL, Wise M, Morgan OW.** Population incidence of Guillain-Barré syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 36: 123–133, 2011. doi:10.1159/000324710.
8. **Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, HLH Across Speciality Collaboration, UK.** COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 395: 1033–1034, 2020. doi:10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
9. **Venkatesan P.** NICE guideline on long COVID. *Lancet Respir Med* 9: 129, 2021. doi:10.1016/S2213-2600(21)00031-X.
10. **Hart A.** Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. *BMJ* 323: 391–393, 2001. doi:10.1136/bmj.323.7309.391.
11. **Kumar A, Saluja N, Purohit R, Choudhary S.** Comparison of motor and sensory nerve conduction in upper limb of diabetics and non diabetics. *J Evol Med Dental Sci* 4: 211–216, 2015. doi:10.14260/jemds/2015/34.
12. **Behse F, Buchthal F.** Normal sensory conduction in the nerves of the leg in men. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 34: 404–414, 1971. doi:10.1136/jnnp.34.4.404.
13. **Ghiasvand F, Ghadimi M, Ghadimi F, Safarpour S, Hosseinzadeh R, SeyedAlinaghi S.** Symmetrical polyneuropathy in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *IDCases* 21: e00815, 2020. doi:10.1016/j.idcr.2020.e00815.
14. **Baj J, Karakuła-Juchnowicz H, Teresiński G, Buszewicz G, Ciesielka M, Sitarz R, Forma A, Karakuła K, Flieger W, Portincasa P, Maciejewski R.** COVID-19: specific and non-specific clinical manifestations and symptoms: the current state of knowledge. *J Clin Med* 9: 1753, 2020. doi:10.3390/jcm9061753.
15. **Oaklander AL, Nolano M.** Scientific advances in and clinical approaches to small-fiber polyneuropathy: a review. *JAMA Neurol* 76: 1240–1251, 2019. [Erratum in *JAMA Neurol* 76: 1520, 2019] doi:10.1001/jama.2019.2917.
16. **Davis HE, Assaf GS, McCorkell L, Wei H, Low RJ, Re'em Y, Redfield S, Austin JP, Akrami A.** Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. *EClinicalMedicine* 38: 101019, 2021. doi:10.1016/j.eclinm.2021.101019.
17. **Eilul MA, Benjamin L, Singh B, Lant S, Michael BD, Easton A, Kneen R, Defres S, Sejvar J, Solomon T.** Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol* 19: 767–783, 2020. doi:10.1016/S1474-4422(20)30221-0.
18. **Bromberg MB.** An electrodiagnostic approach to the evaluation of peripheral neuropathies. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 24: 153–168, 2013. doi:10.1016/j.pmr.2012.08.020.
19. **Oaklander AL, Mills AJ, Kelley M, Toran LS, Smith B, Dalakas MC, Nath A.** Peripheral neuropathy evaluations of patients with prolonged long COVID. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 9: e1146, 2022. doi:10.1212/NXI.0000000000001146.
20. **Zubair AS, McAlpine LS, Gardin T, Farhadian S, Kuruvilla DE, Spudich S.** Neuropathogenesis and neurologic manifestations of the coronaviruses in the age of coronavirus disease 2019: a review. *JAMA Neurol* 77: 1018–1027, 2020. doi:10.1001/jama.2020.2065.
21. **Matschke J, Lütgehetmann M, Hagel C, Sperhake JP, Schröder AS, Edler C, Mushumba H, Fitzek A, Allweiss L, Dandri M, Dottermusch M, Heinemann A, Pfeifferle S, Schwabenland M, Sumner Magruder D, Bonn S, Prinz M, Gerloff C, Püschel K, Krasemann S, Aepfelbacher M, Glatzel M.** Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol* 19: 919–929, 2020. doi:10.1016/S1474-4422(20)30308-2.
22. **Schurink B, Roos E, Radonic T, Barbe E, Bouman CSC, de Boer HH, de Bree GJ, Bulle EB, Aronica EM, Florquin S, Fronczek J, Heunks LMA, de Jong MD, Guo L, du Long R, Lutter R, Molenaar PCG, Neefjes-Borst EA, Niessen HWM, van Noesel CJM, Roelofs JJTH, Snijder EJ, Soer EC, Verheij J, Vlaar APJ, Vos W, van der Wal NN, van der Wal AC, van der Valk P, Bugiani M.** Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study. *Lancet Microbe* 1: e290–e299, 2020. doi:10.1016/S2666-5247(20)30144-0.
23. **Ptiha F, Shalom M, Jradeh H.** Neurological symptoms due to Coronavirus disease 2019. *Neuro Int* 12: 8639, 2020. doi:10.4081/ni.2020.8639.
24. **Jothimani D, Kailasam E, Danielraj S, Nallathambi B, Ramachandran H, Sekar P, Manoharan S, Ramani V, Narasimhan G, Kaliamoorthy I, Rela M.** COVID-19: poor outcomes in patients with zinc deficiency. *Int J Infect Dis* 100: 343–349, 2020. doi:10.1016/j.ijid.2020.09.014.
25. **Thomas S, Patel D, Bittel B, Wolski K, Wang Q, Kumar A, Il'Giovine ZJ, Mehra R, McWilliams C, Nissen SE, Desai MY.** Effect on high dose zinc and ascorbic acid supplementation vs usual care on symptom length and reduction among ambulatory patients with SARS-CoV-2 infection: the COVID A to Z randomized clinical trial. *JAMA Netw Open* 4: e210369, 2021. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.0369.