

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Modelli dell'assorbimento postprandiale del glucosio in soggetti sani e diabetici
di tipo 2 nell'arco della giornata**

Relatore: Prof. ssa Chiara Dalla Man

Laureando: Andrea Corrado

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 21/07/2022

Indice

1	Introduzione	5
1.1	Il diabete	5
1.1.1	Il pancreas	5
1.1.2	Il diabete mellito di tipo 1: cenni	7
1.1.3	Il diabete mellito di tipo 2	7
1.1.4	Insorgenza del diabete di tipo 2	9
1.2	Scopo dello studio	10
1.3	Contenuto della tesi	10
2	Metodi	13
2.1	Stima dei flussi postprandiali del glucosio	13
2.2	Dati e protocollo sperimentale	16
2.3	Il modello	18
2.3.1	Parametri	19
2.3.2	Stima Parametrica	21
2.4	Implementazione in Matlab	22
2.4.1	Modifiche alle ipotesi sull'ingresso	23
2.5	Analisi statistica	25
2.5.1	Analisi della varianza per misure ripetute	25
2.5.2	Test di Student	27
3	Risultati	29
3.1	Confronti tra le diverse implementazioni	29
3.2	Risultati dei test statistici	35
4	Discussione	41
	Bibliografia	45

Abstract

La comprensione del funzionamento fisiologico del corpo umano è una problematica tanto medica quanto ingegneristica e, in un mondo sempre più pervaso dalla tecnologia e che guarda un futuro orientato all'utilizzo di metodi sempre più sofisticati per la cura delle malattie, risulta di fondamentale importanza.

In questo contesto si inserisce il seguente studio, con lo scopo di comprendere quali siano le differenze nella comparsa nel sangue del glucosio ingerito durante un pasto tra i soggetti sani e i soggetti affetti da diabete di tipo 2 nel corso della giornata.

Per farlo, si sono studiati 19 soggetti sani e altrettanti affetti da diabete di tipo 2, somministrando loro una porzione gelatinosa di glucosio in tre orari differenti e rilevando i profili di comparsa del glucosio nel sangue mediante una tecnica a triplo tracciante.

Successivamente, i dati sono stati analizzati mediante un modello matematico pubblicato in letteratura. L'ottimizzazione dei parametri del modello ha richiesto di formulare opportune ipotesi tanto sui dati quanto sulla natura dell'ingresso e, di conseguenza, delle modifiche rispetto all'algoritmo originale.

I risultati ottenuti con diversi settings sono stati quindi confrontati al fine di determinare quali siano le differenze nei parametri stimati per i diversi pool di soggetti nei vari orari, in quanto le differenze fisiologiche tra i vari soggetti nei vari orari dei pasti si manifestano in variazioni dei parametri del modello.

Una volta individuate le ipotesi migliori per l'identificazione del modello, lo studio è stato fatto mediante dei test statistici. L'analisi della varianza ha messo in luce l'esistenza di differenze nei parametri che descrivono la velocità di svuotamento dello stomaco, tanto nei soggetti sani quanto nei soggetti affetti da diabete, lasciando supporre che l'influenza della patologia del diabete incida sul metabolismo del glucosio in modo differente nelle ore del giorno.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Il diabete

Il diabete è una patologia cronica con casi in continuo aumento. Come riportato dall'Istituto Superiore di Sanità, il diabete mellito non solo è sempre più presente nelle società, ma è salito alla nona posizione tra le cause di morte nel mondo [1].

L'aumento del numero delle persone obese, in particolare soggetti in età pediatrica o giovane, nei paesi industrializzati e l'inclinazione sempre maggiore verso uno stile di vita sedentario sono solo alcuni dei fattori alla base di questa tendenza.

Risulta chiaro quindi che una sempre migliore comprensione di questa patologia sia di fondamentale importanza per la società del futuro. Studi e ricerche hanno permesso, permettono e permetteranno una migliore descrizione dei fenomeni che portano all'insorgenza di questa malattia oltre che il perfezionamento delle terapie. Nel frattempo, sempre più nuove tecnologie sono disponibili come potenziali nuovi strumenti per il trattamento.

Il diabete è quindi tanto una sfida sanitaria quanto ingegneristica.

1.1.1 Il pancreas

Il pancreas è una ghiandola oblunga e piatta situata nell'addome, appena dietro allo stomaco e leggermente spostato verso sinistra.

Le funzioni del pancreas sono molteplici e tra esse spicca la secrezione di particolari ormoni atti a regolare, in maniera coordinata, il metabolismo di zuccheri, acidi grassi, e aminoacidi: l'insulina e il glucagone [2].

Le cellule endocrine del pancreas formano dei raggruppamenti, chiamati Isole di Langerhans,

che costituiscono l'1-2% della massa pancreatica totale. Le Isole di Langerhans sono a loro volta costituite da quattro differenti tipologie di cellule, ognuna specializzata nella secrezione di un particolare ormone: *cellule α* , che secernono *glucagone*, *cellule β* , che secernono *insulina*, *cellule δ* , che secernono *somatostatina* ed infine le restanti sono atte alla secrezione di *polipeptidi pancreatici*.

Il corretto funzionamento fisiologico del pancreas *endocrino* è alla base di un metabolismo sano. Quando esso, per motivi endogeni o esogeni, non riesce più ad espletare le sue funzioni, si incorre in patologie, spesso croniche, quali il diabete mellito di tipo 1. D'altro canto, l'insorgenza di altre malattie del metabolismo, come il diabete mellito di tipo 2, non sono collegate esclusivamente ad uno scorretto funzionamento del pancreas, bensì, come spiegato nel seguito, anche a fattori esterni come l'insulino resistenza.

Il delicato equilibrio dell'insulina e del glucagone permette la regolazione della concentrazione di glucosio del sangue, ossia la glicemia. Pertanto, risulta interessante ai fini dello studio comprendere quali siano le peculiarità di questi ormoni al fine di determinare, almeno parzialmente, quali siano i fattori che regolano la comparsa del glucosio ematico.

L'*insulina* è l'ormone dell'abbondanza, in quanto essa assicura che l'eccesso di nutrienti eventualmente presenti venga depositato sotto forma di tessuto adiposo [3]. Tra le varie funzioni di diminuzione svolte dall'insulina vi è l'effetto ipoglicemico. Esso si può spiegare in due modi: in primo luogo, l'insulina limita l'ulteriore comparsa di glucosio nel sangue in seguito all'ingestione di carboidrati, secondariamente, l'insulina stimola il trasporto del glucosio verso le cellule bersaglio dei gruppi muscolari interessati. Quest'ultimo fenomeno è associato alla produzione di glicogeno sia epatico che muscolare, una fonte di energia a rapida attivazione a disposizione dell'organismo.

Se l'insulina è l'ormone dell'abbondanza, il *glucagone* è l'ormone del digiuno [4]. Infatti, esso promuove il consumo delle energie a disposizione dell'organismo e in particolare, l'utilizzo delle risorse che l'insulina con la sua azione ha precedentemente depositato.

Esso agisce in maniera più specifica verso il fegato, andando a stimolare la trasformazione del glicogeno in glucosio che entrerà nella circolazione ematica.

Risulta chiaro quindi che uno dei principali effetti del glicogeno è quello di aumentare la glicemia. Per farlo, oltre a stimolare la sintesi del glucosio dal glicogeno, inibisce il processo inverso.

1.1.2 Il diabete mellito di tipo 1: cenni

Il diabete mellito di tipo 1 insorge quando le *cellule β* delle isole di Langerhans smettono, per qualche motivo, di secernere insulina [5]. Il soggetto diventa pertanto insulino-dipendente in quanto non riesce più a provvedere alla secrezione di questo ormone in modo autologo e necessita di una terapia sostitutiva.

Il diabete mellito insulino-dipendente porta a diverse alterazioni: aumento della glicemia, aumento della concentrazione ematica di acidi grassi, chetoacidi e aminoacidi.

Questi fenomeni portano a una riduzione di massa magra, diuresi metabolica e iperpotassiemia

¹

1.1.3 Il diabete mellito di tipo 2

Il diabete mellito di tipo 2, in passato chiamato anche diabete non insulino-dipendente, è la forma più comune di diabete attualmente presente nella società [6]. La patologia altera tanto l'azione dell'insulina quanto la secrezione, aspetti che sono tipicamente entrambi presenti al momento della diagnosi clinica, talvolta tardiva. Il diabete di tipo 2 infatti, resta spesso senza diagnosi in quanto frequentemente insorge in forma asintomatica.

Anche i paesi dove si gode di un buon servizio sanitario, per ogni caso di diabete di tipo II diagnosticato si stima ve ne sia almeno un altro ancora senza diagnosi. La situazione peggiora notevolmente nei paesi meno sviluppati.

Il diabete di tipo 2 si manifesta principalmente con la presenza di insulino-resistenza ed alterazioni della tolleranza glucidica. Per comprendere meglio come questi fenomeni si susseguano fino a sfociare nella malattia, si riporta qualche accenno ai fattori che ne influenzano maggiormente l'insorgenza e l'evoluzione. Diversi studi dimostrano come fattori genetici, ambientali, fisici siano alla base della comparsa della malattia.

I *fattori genetici* sono spesso correlati a fattori esterni all'ambiente autologo (fattori *ambientali*) ed infatti le maggiori evidenze dell'importanza di questo fattore si sono determinate dallo studio dei gruppi etnici e, secondariamente, dei gemelli (per studi intra-familiari) [8]. L'incidenza di casi di diabete di tipo II nei gruppi etnici appartenenti alle stesse comunità varia considerevolmente, aspetto che si ritiene essere correlato alla suscettibilità genetica, ossia la carica genetica in grado di influenzare il fenotipo di una determinata popolazione.

¹ L'insulina agisce come promotrice dell'assunzione dello ione potassio nelle cellule

Studi simili hanno dimostrato che è possibile l'esistenza di sequenze genetiche nei cromosomi che siano in qualche modo legate alla comparsa della patologia [8]. Pertanto, non sorprende come in popolazioni differenti (e dunque in ambienti differenti) vi siano evidenti variazioni nella suscettibilità genetica entro differenti pool genetici. Il sequenziamento e lo studio del genoma umano potrà dare delle risposte in merito a questi aspetti.

In conclusione, i fattori genetici si presume siano direttamente collegati all'insorgenza della patologia, pur essendo questa a sua volta correlata a diversi fattori ambientali esterni.

I *fattori ambientali* che influenzano la comparsa della malattia sono stati ampiamente studiati nelle popolazioni di migranti confrontate con i gruppi che vivono ancora nel Paese d'origine [8]. Uno studio piuttosto importante dimostrò come la componente di popolazione polinesiana migrata nell'isola Wallis dalla Nuova Guinea avesse, a parità di età, un'incidenza del diabete di tipo 2 del 3%, contro il 12% della popolazione rimasta nella terra natia [8].

Altri aspetti, come l'aumento dell'aspettativa di vita, la diminuzione dei casi di morte per diabete mellito e per malattie cardiovascolari, l'adozione progressiva di abitudini sedentarie, sono collegati all'aumento dell'incidenza della malattia. Pur essendo correlati a fattori ambientali, questi ultimi aspetti sono fortemente legati allo stile di vita personale. Pertanto, una disamina dei fattori scatenanti la patologia non può essere completa senza descrizione dell'effetto dell'obesità e dello stile di vita attivo sulla comparsa della patologia.

L'*obesità* è una delle principali cause dell'aumento dei casi di diabete. Diversi studi dimostrano come l'insorgenza della malattia risulti più probabile se, insieme all'obesità, dovessero esser presenti dei precedenti della patologia nei parenti più stretti [1].

Infatti, il rischio di contrarre la malattia per le persone obese che hanno dei parenti già affetti da diabete di tipo 2 è molto maggiore che per coloro i quali, pur essendo in sovrappeso, non presentano casi pregressi della patologia nei familiari [7].

Non solo la condizione di sovrappeso ma anche la distribuzione del grasso corporeo sembrerebbe essere correlata con l'insorgenza della malattia. In particolare, l'insulino resistenza, fattore scatenante, sembrerebbe essere una caratteristica comune a coloro i quali presentano un accumulo di grasso addominale. L'insulino resistenza, come discusso in questa sezione, non è necessariamente l'esclusivo fattore scatenante della malattia, ciò nonostante, nella maggioranza dei casi ne predice e precede l'insorgenza.

In conclusione, l'obesità non è necessariamente correlata all'insorgenza del diabete ma è uno dei fattori che ne potrebbe determinare l'evoluzione.

Uno stile di vita sano, entro il quale trova spazio l'attività fisica, risulta essere uno dei maggiori fattori preventivi alla comparsa della malattia. Diversi studi dimostrano come la prevalenza del diabete di tipo 2 sia tre volte maggiore nei soggetti inattivi rispetto a quelli dediti all'attività fisica. Altrettanti studi dimostrano come, per avere un'efficace prevenzione, sia sufficiente un modesto livello di attività [8]. Anche l'attività sportiva risulta essere fortemente condizionata da fattori ambientali. Ad esempio, la progressiva migrazione verso zone urbane, ha ridotto fortemente il grado di attività a favore di una più probabile insorgenza della malattia.

Chiaramente, l'attività sportiva non potrebbe nulla se non accompagnata da una dieta sana e bilanciata, ricca di fibre e povera di grassi. In particolare, popolazioni che sono maggiormente colpite dal diabete di tipo 2, presentano mediamente un elevato consumo di grassi saturi nell'alimentazione quotidiana.

1.1.4 Insorgenza del diabete di tipo 2

Il diabete di tipo 2 insorge quando, a seguito delle circostanze discusse, nei soggetti a rischio si innesca una catena di eventi che portano dall'insulino-resistenza all'alterazione della tolleranza glucidica e in conclusione alla riduzione dell'attività delle cellule β del pancreas (1.1).

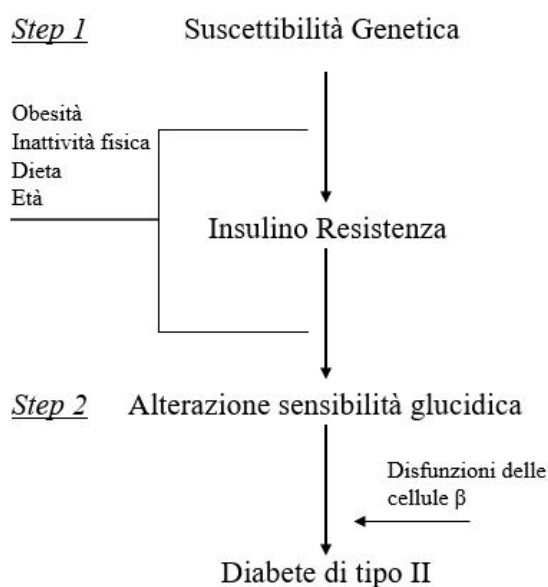


Figura 1.1: Passi principali per l'insorgenza della patologia, schema adattato da [8]

L'insulino resistenza e l'alterazione della tolleranza glucidica sono strettamente correlate. In particolare, i livelli di insulina mostrano un marcato aumento fintantoché non si sviluppano alterazioni nella tolleranza glucidica, in seguito, il livello si stabilizza ed entrambi i fenomeni

precursori della patologia sono irreversibili. L'aumento dei livelli di insulina è correlato all'aumento dell'insulino-resistenza delle cellule con definitiva insorgenza della malattia.

Tanto l'insulino resistenza che le alterazioni della tolleranza glucidica sono dovute a obesità, scarsa attività fisica, fattori genetici e ambientali.

Infine, questi fattori portano gradualmente alla perdita di funzionalità delle cellule β , con conseguente aumento dei livelli di glicemia non più contrastato dall'insulina.

1.2 Scopo dello studio

Il presente elaborato ha lo scopo di evidenziare le differenze che sussistono tra soggetti sani e soggetti affetti da diabete di tipo 2 nell'arco della giornata per quanto concerne il tasso di comparsa del glucosio nella circolazione ematica. Si è posta l'attenzione sui pasti principali: colazione, pranzo e cena, e si sono ricercate evidenze statistiche delle possibili differenze tra questi soggetti nelle ventiquattro ore.

La caratterizzazione del comportamento dei soggetti è stata fatta in seguito all'ottimizzazione di un modello, e pertanto un fine secondario della tesi è quello di presentare delle ipotesi sul modello quanto più possibile aderenti ai dati reali.

1.3 Contenuto della tesi

Il capitolo introduttivo si apre con la descrizione del diabete, del pancreas e del sistema di regolazione del glucosio nel sangue. In un primo momento si presentano gli aspetti inerenti alla fisiologia del pancreas, focalizzandosi sul ruolo dell'insulina e del glucagone. Successivamente, si apre una sezione dedicata alle forme di diabete, con particolare attenzione sul diabete di tipo 2. Qui vengono presentati i fattori che influenzano l'insorgenza della malattia al fine di poter comprendere meglio quali siano le sue peculiarità.

Il capitolo dedicato ai metodi comincia con un paragrafo dedicato ai metodi per la caratterizzazione del glucosio nel sangue, dove viene esposto il procedimento che, mediante l'uso di tre traccianti, porta alla determinazione delle grandezze descrittive della cinetica del glucosio nel sangue.

In seguito, presenta il protocollo sperimentale adottato ai dati raccolti, con particolare riferimento alla loro struttura e alle loro caratteristiche.

Successivamente viene descritto il modello, andando a commentarne la struttura e i parametri.

Il paragrafo seguente è dedicato ai metodi di stima dei parametri e pertanto alla teoria matematica alla base del funzionamento dell'algoritmo di calcolo numerico usato.

Successivamente viene presentata l'implementazione del modello in ambiente Matlab. In questa sede viene posta l'attenzione sulle modifiche apportate al codice inizialmente disponibile, giustificandole mediante nuove ipotesi sui dati e sulla tipologia d'ingresso.

Infine vengono presentati i metodi di analisi statistica che sono stati impiegati per l'elaborazione dei risultati, in particolare, si è fatto uso dell'analisi della varianza (ANOVA) e del T-test, la cui formulazione sarà discussa in questa sede.

Il terzo capitolo mostra i risultati ottenuti dall'elaborazione numerica e dall'analisi statistica. In particolare, presenta le motivazioni che hanno portato alla scelta di una determinata configurazione del modello e di essa se ne mostrano i risultati complessivi sia in forma tabellare che grafica.

Successivamente vengono presentati gli esiti dell'analisi statistica eseguita sul modello scelto, focalizzandosi, anche con l'aiuto di diagrammi, sull'entità della differenza riscontrata nei parametri nei soggetti normali e diabetici di tipo 2 a colazione, pranzo e cena.

Infine il capitolo dedicato alla discussione finale raccoglie i passi affrontati nello studio e ne trae le conclusioni. In particolare, in esso si verifica la ragionevolezza dell'ingresso impiegato per il modello e si teorizza una possibile interpretazione dei valori dei parametri.

Capitolo 2

Metodi

2.1 Stima dei flussi postprandiali del glucosio

La descrizione dei processi di comparsa del glucosio nel sangue non sarebbe possibile senza l'utilizzo di metodi quantitativi. Tali metodi sono stati studiati [9] al fine di poter ricavare diversi descrittori del fenomeno di comparsa del glucosio nel sangue. In particolare, ai fini dello studio, è necessario quantificare:

- *Tasso di comparsa del glucosio ingerito Ra_{meal}*
- *Produzione endogena di glucosio EGP*
- *Tasso di scomparsa del glucosio ingerito R_d*

Alla base della metodologia utilizzata per la quantificazione delle due forme di glucosio (endogeno e ingerito) vi è l'utilizzo di tre traccianti differenti. Il primo, $[1 - C^{13}]$ glucosio, viene ingerito e serve a quantificare Ra_{meal} ; gli altri due, $[6 - H^3]$ glucosio e $[6, 6 - H_2^2]$ glucosio, vengono somministrati per via venosa (tipicamente mediante due cannule posizionate sulla mano) al fine di minimizzare le variazioni dei rapporti tra le concentrazioni, di $[6 - H^3]$ glucosio e $[1 - C^{13}]$ glucosio e di $[6, 6 - H_2^2]$ glucosio e glucosio endogeno. In questo modo, la quantificazione dei flussi di Ra_{meal} ed EGP risulta quasi modello-indipendente [9].

Una volta determinati tali flussi è possibile, in linea teorica, determinare il *tasso di variazione del glucosio nel plasma* tramite differenza tra il quantitativo in ingresso ed in uscita del glucosio nella circolazione sistemica.

Per attuare questa strategia non si può prescindere dalle difficoltà che si riscontrano quando si cerca di misurare con accuratezza il contributo del glucosio prodotto dal fegato, ossia EGP , e

la dinamica del metabolismo del glucosio ingerito. Infatti, sia il contributo del glucosio esogeno che endogeno sono tempo varianti e pertanto il fenomeno di comparsa del glucosio nel sangue è, in definitiva, non stazionario.

Per la descrizione di questo fenomeno particolare, sono stati proposti vari metodi ma, attualmente, quello più affidabile fa uso di un modello bicompartimentale che tiene conto, nella sua formulazione, della proprietà di tempo-varianza dell'*EGP* e di non stazionarietà dei flussi dei parametri analizzati. Il modello cerca quindi di predire quali saranno le variazioni future di *EGP* e Ra_{meal} .

Prima di esporre le equazioni che permettono di ricavare le grandezze ricercate è necessario introdurre la successiva notazione utilizzata:

- *tracee*: glucosio naturalmente presente nel sangue, derivante da via endogene e esogene
- $tracer^I$: $[1 - C^{13}]$ glucosio
- $tracer^{II}$: $[6,6 - H_2^2]$ glucosio
- $tracer^{III}$: $[6 - H^3]$ glucosio
- G_{nat} : concentrazione di glucosio naturalmente presente nel plasma
- $G_{C^{13}}$: concentrazione di $tracer^I$ nel plasma
- $G_{H_2^2}$: concentrazione di $tracer^{II}$ nel plasma
- G_{H^3} : concentrazione di $tracer^{III}$ nel plasma
- $F_{H_2^2}$: tasso di somministrazione intravenosa di $tracer^{II}$
- F_{H^3} : tasso di somministrazione intravenosa di $tracer^{III}$
- ttr_{meal} : glucosio naturalmente presente nel pasto
- G : concentrazione plasmatica di glucosio misurata nel sangue venoso

Assunta la notazione presentata, vengono riportate le equazioni che descrivono le grandezze in esame secondo l'approccio a tre traccianti descritto con il modello bicompartimentale. Con esso, è possibile calcolare Ra_{meal} come:

$$Ra_{meal} = Ra_{c^{13}} \cdot \left(\frac{tracee + tracer^I}{tracer^I} \right) = Ra_{c^{13}} \cdot \left(\frac{1}{ttr_{meal} + 1} \right) \quad (2.1)$$

dove per $Ra_{c^{13}}$ è stata assunta una dinamica non stazionaria e pertanto è stato calcolato come:

$$Ra_{c^{13}} = \frac{F_{H^3}}{G_{H^3}/G_{C^{13}}} - \frac{V_1 G_{C^{13}}}{G_{H^3}/G_{C^{13}}} \frac{d(G_{H^3}/G_{C^{13}})}{dt} + k_{12} \left(\frac{Q_{2,H^3}}{G_{H^3}/G_{C^{13}}} - Q_{2,c^{13}} \right) \quad (2.2)$$

In quest'ultima equazione compare il termine k_{12} , coefficiente di scambio tra il compartimento (inteso come zona di rilevazione) accessibile e periferico, fissato a $k_{12} = 0.07 \text{min}^{-1}$ e Q_{2,H^3} , ossia il quantitativo di $[6 - H^3]$ glucosio nel compartimento periferico.

Il profilo di EGP viene invece calcolato come:

$$EGP = \frac{F_{H^2}}{G_{H^2}/G_{end}} - \frac{V_1 G_{end}}{G_{H^2}/G_{end}} \frac{d(G_{H^2}/G_{end})}{dt} + k_{12} \left(\frac{Q_{2,H^2}}{G_{H^2}/G_{end}} - Q_{2,end} \right) \quad (2.3)$$

dove G_{end} rappresenta la concentrazione nel plasma di glucosio derivante da via endogene, ossia la differenza tra il glucosio naturalmente presente nel sangue e la frazione di *tracer*^I sul ttr_{meal} :

$$G_{end} = G_{nat} - \frac{G_{C^{13}}}{ttr_{meal}} \quad (2.4)$$

Infine la predizione di Rd viene determinata come:

$$R_d = (Ra_{meal} + EGP + F_{H^2}) - V_1 \frac{dG}{dt} - k_{21} V_1 G + k_{12} Q_2 \quad (2.5)$$

dove k_{21} è il coefficiente di scambio tra l'ambiente periferico e accessibile, fissato a $k_{21} = 0.05 \text{min}^{-1}$ e V_1 è il volume del glucosio nel plasma, fissato a 130ml/kg .

In conclusione, è necessario fare qualche commento in merito alle reali potenzialità del metodo.

L'utilizzo di un modello bicompartimentale permette una buona stima la stima dei flussi in esame e dunque la misurazione, pur indiretta, dei profili ricercati.

D'altro canto però, questa metodologia presenta necessariamente dei limiti. In particolare, è necessario osservare che, tacitamente, si è assunto possibile poter mimare precisamente l'andamento di Ra_{meal} , e quindi del $[1 - C^{13}]$ glucosio, mediante l'infusione venosa di $[6 - H^3]$ glucosio. Questo è a tutti gli effetti impossibile in quanto il metabolismo del $[1 - C^{13}]$ glucosio è influenzato da molteplici fattori. Pertanto, si deve necessariamente assumere che il valore di Ra_{meal} sia a tutti gli effetti una stima e, come tale, potenzialmente influenzata da errori.

A questo aspetto, si aggiunge anche un secondo fenomeno che è possibile riscontrare quando si

usa questa metodologia: la stima del corretto quantitativo di $[1 - C^{13}]$ glucosio risulta particolarmente complicata nei primi 15 minuti dal pasto.

Ciò nonostante, il metodo a triplo tracciante accoppiato all'uso del modello bicompartimentale, pur introducendo maggior complessità e un errore di stima potenzialmente maggiore, risulta esser più affidabile e preciso dei suoi predecessori^[1]. Infatti, rappresenta un importante passo avanti tanto nella bontà della descrizione dell'andamento dei flussi quanto nella precisione degli stessi dove gli altri modelli, a maggior ragione, fallivano (ad esempio, nei primi 15 minuti dal pasto).

2.2 Dati e protocollo sperimentale

I dati esaminati nel corso dello studio sono stati raccolti in 19 soggetti sani e 19 soggetti affetti da diabete di tipo 2 nei tre pasti principali. In particolare, i dati sono stati rilevati dopo aver somministrato ai soggetti una dose standard di glucosio, in forma gelatinosa, di circa 75g, in tre giorni consecutivi a colazione, pranzo e cena secondo uno schema a quadrato latino.

Il metodo di acquisizione dei dati impiegato è quello a triplo tracciante descritto nel capitolo introduttivo. Con esso, si sono stimati il tasso di comparsa del glucosio nel sangue Ra_{meal} , la produzione endogena di glucosio EGP e il tasso di scomparsa del glucosio R_d .

I dati sono stati raccolti lungo un intervallo temporale di 300 minuti suddivisi in: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300. La dose di glucosio è stata somministrata al minuto zero.

Ai fini della ricerca sono stati impiegati i valori di *comparsa del glucosio nel sangue* Ra_{meal} rilevato in $[\mu\text{mol}/\text{kg}(\text{LBM}) \cdot \text{min}]$ e successivamente convertito in $[\text{mg}/\text{min}]$. Da essi, in una fase precedente all'analisi numerica, si è estratto il valore relativo di *frazione di glucosio assorbito nell'intestino che compare nel plasma* (f)^[2]. Infine, si sono usati i valori di *peso*, la dose effettivamente somministrata in $[\text{Kg}]$ e il valore di *massa magra (LBM)* rilevati, per ogni soggetto, al momento dell'acquisizione dei dati.

Si rende necessario precisare che per tutte le serie di dati raccolte i valori di Ra rilevati tra il minuto 0 e 15 (incluso) risultavano essere rappresentati con il codice *NaN*. Tale codice viene assegnato a quei dati che, per qualche ragione, non sono rappresentabili con un valore. Non

¹A titolo d'esempio, sono stati utilizzati modelli monocompartimentali, con doppio tracciante e lineari

²Si veda il paragrafo relativo al modello per una descrizione dettagliata

essendo chiare le motivazioni e non potendo risalire ai valori originari in alcun modo si è reso necessario effettuare alcune decisioni sulla gestione di tali valori nella fase di elaborazione numerica. Nel seguito, esse verranno presentate e discusse.

Le figure 2.1 e 2.2 mostrano l'andamento dei valori medi di Ra_{meal} nei tre pasti per i soggetti sani e per i soggetti affetti da diabete di tipo 2. Si noti che i dati relativi ai primi minuti, non essendo disponibili, sono stati considerati nulli.

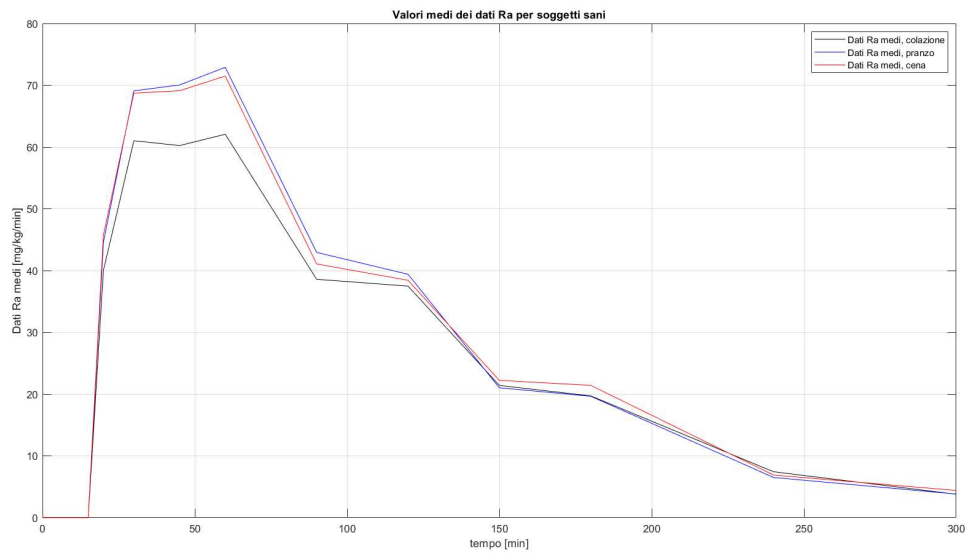


Figura 2.1: Valori di Ra_{meal} per soggetti sani nei tre pasti

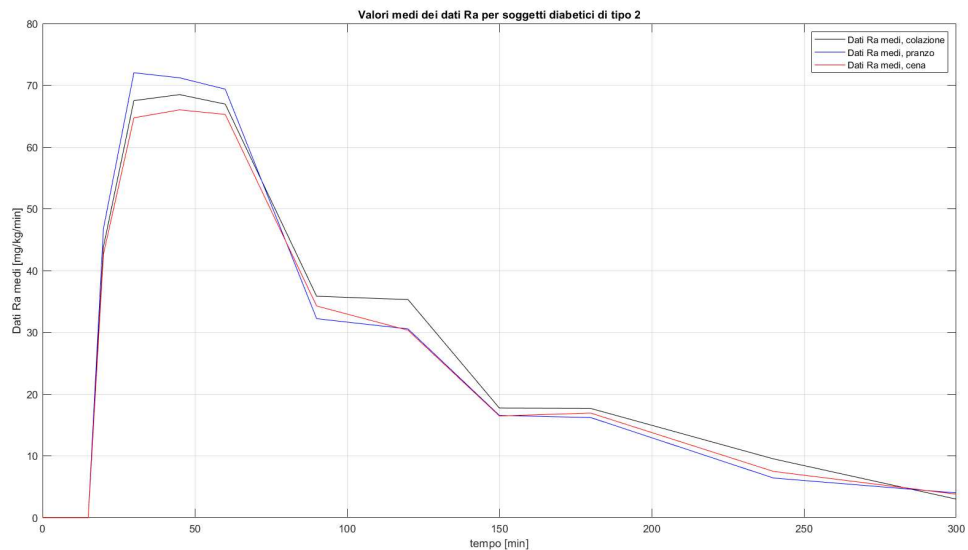


Figura 2.2: Valori di Ra_{meal} per soggetti affetti da diabete di tipo 2 nei tre pasti

2.3 Il modello

Il modello implementato è stato validato nel 2006 su dati gold standard [10] e prevede l'utilizzo di una struttura a tre compartimenti in catena. I primi due compartimenti rappresentano lo stomaco, immaginato come composto da una *fase liquida* e una *fase solida*, mentre il terzo rappresenta l'intestino. La figura 2.3 mostra una visualizzazione grafica del modello.

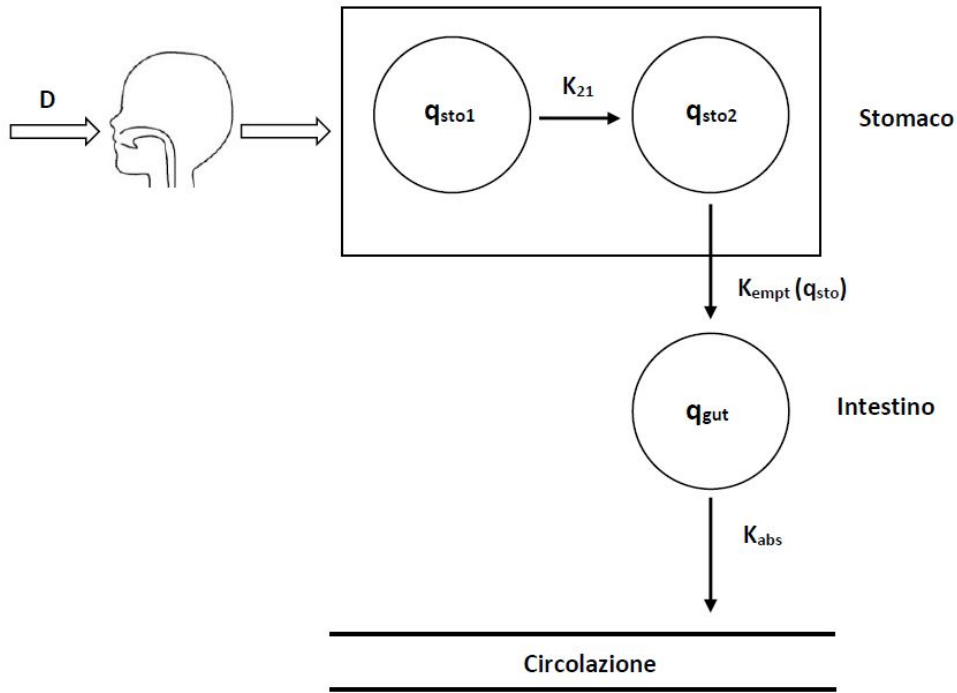


Figura 2.3: Schema a blocchi del modello

Le equazioni del modello sono:

$$\begin{cases} \dot{q}_{sto1}(t) = -k_{21} \cdot q_{sto1}(t) + D\delta(t) \\ \dot{q}_{sto2}(t) = -k_{empt} \cdot q_{sto2}(t) + k_{21} \cdot q_{sto1}(t) \\ \dot{q}_{gut}(t) = -k_{abs} \cdot q_{gut}(t) + k_{empt} \cdot q_{sto2}(t) \\ Ra(t) = f \cdot k_{abs} \cdot q_{gut}(t) \end{cases}$$

Nelle equazioni vengono introdotti i termini q_{sto1} e q_{sto2} , relativi all'ammontare di glucosio nello stomaco (e dunque rappresentativi dei quantitativi di glucosio nelle due fasi) e q_{gut} , che rappresenta la componente glucidica nell'intestino.

Il termine f rappresenta la frazione di glucosio presente nell'intestino che *effettivamente* com-

pare nel plasma. Essa è definita come:

$$f = \frac{\int_0^\infty Ra(t) dt}{D} \quad (2.6)$$

Si noti che tale definizione presuppone la conoscenza della funzione $Ra(t)$. Disponendo dei soli dati relativi agli istanti temporali di rilevazione, il valore di f può essere approssimato mediante la sommatoria:

$$f \approx \sum_{i=1}^N \frac{[Ra(t_i) + Ra(t_{i+1})] \cdot (t_i - t_{i-1})}{2 \cdot D} \quad (2.7)$$

dove Ra è espresso in $[mg/min]$, D in $[Kg]$ e t è l'istante temporale.

Infine, si osservi l'ingresso impulsivo, modulato dalla dose di glucosio D , ipotizzato nella prima equazione: su di esso verranno fatti nel seguito dei commenti circa la sua aderenza alla realtà. I parametri che caratterizzano il modello, essendo scopo di studio, vengo presentati nel paragrafo successivo per una maggior chiarezza.

2.3.1 Parametri

I parametri del modello sono i coefficienti che modulano lo scambio di glucosio tra i vari stadi e vengono stimati nella fase di elaborazione numerica. Il primo di essi è k_{21} , ossia la velocità di passaggio da fase solida a liquida del glucosio; segue k_{empt} , velocità di svuotamento dello stomaco ed infine k_{abs} , velocità di assorbimento del glucosio dall'intestino alla circolazione ematica.

Si rende necessario osservare che k_{empt} e k_{abs} sono a loro volta descritti da altri parametri. In particolare k_{empt} è definito come funzione dell'ammontare complessivo di glucosio nello stomaco, ossia:

$$k_{empt}(q_{sto1}) = k_{min} + \frac{k_{max} - k_{min}}{2} \cdot \{\tanh[\alpha(q_{sto} - b \cdot D)] - \tanh[\beta(q_{sto} - c \cdot D)]\} \quad (2.8)$$

dove: $q_{sto} = q_{sto1}(t) + q_{sto2}(t)$

Questa riscrittura di k_{empt} introduce a sua volta quattro parametri (α e β saranno funzione di a e b):

- k_{max} è il valore massimo assunto da k_{empt} quando lo stomaco contiene la dose di glucosio D . Da questo valore scende con velocità α fino al minimo. Tale velocità, imponendo che

$k_{empt} = k_{max}$, $q_{sto} = D$, è data da:

$$\alpha = \frac{5}{2 \cdot D \cdot (1 - b)} \quad (2.9)$$

- k_{min} è il valore minimo assunto da k_{empt} . Dopo averlo raggiunto, risale con velocità β fino, di nuovo, al massimo. Questa velocità è definita, imponendo che $k_{empt} = k_{max}$, $q_{sto} = 0$, come:

$$\beta = \frac{5}{2 \cdot D \cdot c} \quad (2.10)$$

- b è la frazione della dose per la quale k_{empt} giunge a $(k_{max} - k_{min})/2$ scendendo dal suo valore massimo.
- c è la frazione della dose per la quale k_{empt} giunge a $(k_{max} - k_{min})/2$ risalendo dal suo valore minimo.

Per una miglior comprensione del significato dei parametri riportati si rimanda alla figura [2.4](#).

Si noti che l'evoluzione temporale di k_{empt} sia da leggersi da *destra verso sinistra*.

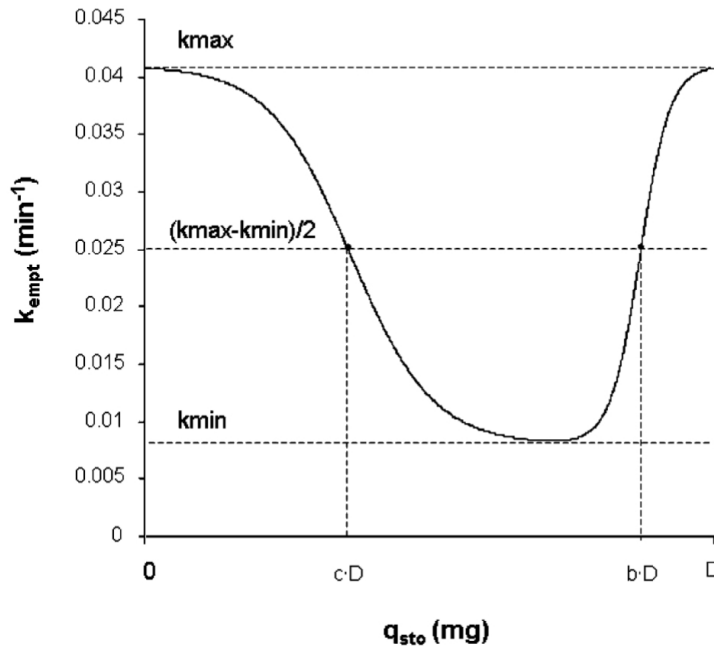


Figura 2.4: Andamento qualitativo di k_{empt}

Dall'introduzione dei parametri risulta evidente che, mediante analisi numerica, verranno stimati i valori di k_{max} , k_{min} , k_{abs} , b e c . Sono sufficienti cinque parametri in quanto, al fine di rendere il modello univocamente identificabile, si assume l'ipotesi $K_{12} = K_{empt}$ e $K_{empt} > K_{abs}$.

2.3.2 Stima Parametrica

I metodi di stima dei parametri sono molteplici. Tra quelli che sono gli approcci di Fischer per la stima parametrica, nell'implementazione del modello in ambiente Matlab viene utilizzato il metodo degli scarti quadratici [13].

Tale procedimento presuppone che i parametri siano stimabili minimizzando l'errore commesso tra i dati e la predizione del modello, note le equazioni che ne governano la dinamica. Per farlo, si assuma che l'errore tra i dati z e la predizione del modello $G(p)$ (dove p e z sono vettori e $G(p)$ è funzione vettoriale) sia:

$$e(p) = z - G(p) \quad (2.11)$$

e di esso ne si prenda la norma al quadrato nella forma:

$$J_{ls}(p) = [z - G(p)]^T B^{-1} [z - G(p)] \quad (2.12)$$

Dove la matrice B permette di considerare dati influenzati da differenti varianze e prende il nome di matrice di ponderazione.

Si vuole determinare il vettore dei parametri $\bar{p}$ che minimizza la funzione $J_{ls}(p)$:

$$\bar{p} = \operatorname{argmin}[J_{ls}] = \operatorname{argmin}\{[z - G(p)]^T B^{-1} [z - G(p)]\} \quad (2.13)$$

Questa equazione ammette soluzioni esatte solo nel caso in cui la funzione $G(p)$ dipende linearmente da p . Poiché tipicamente questo non avviene, si rende necessario l'utilizzo di metodi numerici, dei quali il maggiormente noto è quello Gauss-Newton.

Tale metodo utilizza una funzione gradiente per determinare la miglior approssimazione dei parametri a partire da un valore iniziale p_0 fissato mediante stime precedenti.

Una volta stimati i parametri è necessario valutare la bontà della predizione del modello e dunque della stima stessa. Uno dei metodi più largamente utilizzati utilizza i residui pesati (al quadrato). Essi vengono calcolati a partire dalla funzione delle *predizione* dei parametri $G(\bar{p})$ (si noti che tale funzione è l'uscita del modello quando i parametri sono quelli stimati) e dai dati reali z . Dalla definizione di vettore dei residui:

$$r = z - G(\bar{p}) \quad (2.14)$$

si ottiene la norma al quadrato del vettore dei residui come:

$$WRSS = r^T B^{-1} r \quad (2.15)$$

L'utilizzo dei residui pesati permette, mediante la valutazione della bianchezza dei residui pesati, di soppesare la bontà della stima del modello in termini qualitativi. Inoltre, la valutazione della somma dei residui permette di apprezzare quale modello predica più efficacemente i dati. Questo perché un minor valore della somma dei $WRSS$ implica una maggior vicinanza della curva di predizione ai dati reali e dunque una maggior qualità del modello.

Infine si vanno a valutare gli indici di variabilità dei parametri (CV). Se l'analisi dei residui pesati permette la valutazione della predizione del modello, lo studio degli indici di variabilità permette di valutare quale sia la distribuzione dei valori assunti da un parametro e di conseguenza consente di quantificarne la precisione. Gli indici di variabilità sono calcolati mediante le medesime funzioni di calcolo numerico che permettono la stima dei parametri nell'algoritmo Matlab.

2.4 Implementazione in Matlab

Come anticipato nei paragrafi precedenti l'ambiente di calcolo che è stato utilizzato è Matlab. In questa sezione verrà descritto brevemente il codice e si porrà l'accento sulle modifiche apportate sia per migliorarne la gestione di particolari dati che per migliorarne la predizione mediante differenti ipotesi sull'ingresso.

L'algoritmo che implementa il modello si apre con una sezione dedicata alla casistica in esame. Qui trovano spazio i dati da elaborare: *Ra*, *peso soggetto*, *f*, *dose*, *varianza* e *tempo*. Tali valori, come anticipato nella sezione dedicata, sono stati raccolti per soggetti sani e soggetti affetti da diabete di tipo 2 nei tre pasti principali della giornata. Le serie di dati da analizzare saranno quindi sei, tre per ogni classe di soggetti.

Successivamente, il corpo centrale del codice, realizzato mediante un ciclo, presenta due macro sezioni: una dedicata alle ipotesi preliminari e una all'effettivo procedimento di stima dei parametri e della predizione del modello.

La sezione dedicata alle ipotesi preliminari permette di:

1. Caricare i dati relativi al soggetto in esame e definire i *flags* per le successive funzioni. L'utilizzo di *flags* (valori booleani) permette di controllare se l'algoritmo dovrà utilizzare determinate funzioni e/o un ingresso che non sia quello impulsivo.
2. Gestire i dati *NaN* ponendoli a zero e dando loro un peso (idealmente) nullo, in modo che l'elaborazione numerica successiva non venga interrotta.
3. Gestire le eventuali *colonne* di dati *NaN*. In tal caso, il modello è stato modificato per procedere con l'iterazione successiva pur salvando dei risultati (anch'essi *NaN*) in modo da conservare l'informazione relativa alla locazione della colonna anomala e quindi l'indicizzazione dei soggetti.
4. Fissare il valore iniziale dei parametri (da dati empirici) e definire i limiti dei passi iterativi della funzione che andrà a determinare le soluzioni del modello.

La sezione dedicata invece alla stima dei parametri e della predizione del modello utilizza funzioni *built-in* di Matlab per determinare i valori cercati e delle funzioni *aggiuntive* che permettono una miglior gestione del codice. In particolare la funzione di stima dei parametri invoca la funzione di risoluzione nella quale a sua volta viene chiamata la funzione che implementa le equazioni del modello. In quest'ultima viene implementato anche l'ingresso mediante interpolazione lineare.

Questa catena si conclude con una prima stima dei parametri, dai quali vengono estratti i valori finali. Questo passaggio è necessario in quanto la funzione di stima calcola la predizione di parametri che non sono *esattamente* quelli descritti nella sezione introduttiva bensì i valori di: k_{min} , k_{abs} , $k_{max} - k_{min}$, c e $b - c$. La stima delle differenze tra i parametri permette di rispettare alcuni vincoli intuibili dalla trattazione teorica soprastante, ossia: $k_{max} > k_{min}$ e $b > c$.

Con il calcolo dei valori finali dei parametri e con l'ultima iterazione della funzione di risoluzione delle equazioni del modello si conclude la parte relativa all'elaborazione numerica e i dati vengono così salvati per le valutazioni successive.

2.4.1 Modifiche alle ipotesi sull'ingresso

Il modello, nella sua formulazione teorica, prevede che l'ingresso sia coincidente con l'istante zero del vettore dei tempi. Questa ipotesi si scontra con quella che è la reale struttura dei dati e con la durata temporale di un pasto. In particolare, sorgono due problematiche:

1. Si pongono a zero tutti i valori NaN che si trovano in testa alla serie di dati, conseguentemente l'ingresso impulsivo non è più coincidente con l'istante zero della serie temporale m viene *traslato* all'istante corrispondente all'ultimo valore di Ra_{meal} pari a zero.
2. Un pasto, per quanto il soggetto sia invitato a ingerire la dose di glucosio entro un certo tempo, non è ben rappresentato da un ingresso impulsivo. Questo perché il tempo necessario ad ingerire una dose di circa 75g non è necessariamente di qualche minuto.

Per gestire a queste problematiche si sono fatte delle ipotesi sulle serie di dati ed è stato implementato un ingresso a rettangolo a supporto variabile.

I dati sono stati modificati andando a eliminare, con una serie di elaborazioni successive, le righe relative ai dati NaN ai tempi 5,10,15 minuti³. Questa operazione non solo permette una diversa interpolazione dell'ingresso (e dunque una differente traslazione dell'impulso) ma implica anche un nuovo valore della frazione di glucosio effettivamente presente nell'intestino f , la quale è stata di volta in volta ricalcolata.

Mantenendo l'ingresso impulsivo si sono fatti quattro cicli di elaborazione dei dati.

Per modellare con più accuratezza l'ingestione si è, come anticipato, implementato un ingresso a rettangolo e a tal scopo sono state fatte delle modifiche al codice originale.

Il rettangolo presenta un supporto che si protrae fino al primo istante dove i dati sono diversi da zero e un'area pari alla dose D somministrata al soggetto. Si possono fare delle valutazioni relative proprio alla durata dell'ingresso: andando ad eliminare le righe di dati NaN come descritto in precedenza, il rettangolo diviene via via sempre più breve (e di conseguenza più alto). Risulta quindi importante capire quale sia la dimensione ideale del supporto al fine di garantire la miglior predizione del modello.

In conclusione, si sono eseguiti sette cicli di elaborazione dei dati:

1. quattro cicli con ingresso impulsivo traslato agli istanti 15, 10, 5, 0
2. tre cicli con ingresso a rettangolo con supporto di estensione temporale di 15,20,5 minuti

³I dati presentavano il primo ingresso diverso da zero al minuto 20

2.5 Analisi statistica

L'elaborazione dei dati non consente di evidenziare risultati circa l'esistenza di differenze apprezzabili tra i gruppi in esame nei vari orari del giorno. Pertanto, si rende necessario eseguire un'analisi statistica dei risultati al fine di identificare le eventuali differenze che sussistono nei parametri stimati. Essi infatti, come anticipato in precedenza, sono a tutti gli effetti i descrittori del modello e dunque del comportamento dei soggetti.

Si vuole quindi determinare se esiste una variazione significativa tra i valori dei parametri nei tre pasti della giornata sia tra soggetti sani che soggetti affetti da diabete di tipo 2.

Per farlo, si è scelto di utilizzare *l'analisi della varianza per misure ripetute* e il test di *Student*, noto anche come *t-test*.

I due test sono stati eseguiti in successione: in primo luogo l'analisi della varianza ha dato modo di comprendere in quali parametri esistano differenze, secondariamente il t-test ha permesso di determinare tra quali coppie di parametri siano statisticamente significative.

2.5.1 Analisi della varianza per misure ripetute

L'analisi della varianza per misure ripetute viene utilizzata per determinare la veridicità dell'ipotesi di esistenza di differenze tra gruppi diversi: soggetti sani e affetti da diabete di tipo 2 nei tre pasti della giornata.

Quando ogni elemento di una popolazione [11], in questo caso i soggetti dello studio, viene sottoposto a più trattamenti, la variabilità totale delle osservazioni effettuate, ossia i parametri stimati per essi, può essere suddivisa in tre componenti: variabilità tra *tutti i soggetti sperimentali*, variabilità dovuta ai *trattamenti* ed infine variabilità dovuta alle risposte *individuali* dei soggetti⁴.

Assumendo che tutti i soggetti siano stati sottoposti ai medesimi trattamenti e che la variabilità dovuta alla risposta individuale sia distribuita come una gaussiana, è possibile elaborare la formulazione del test della varianza per misure ripetute, anche chiamato test ANOVA.

Supponiamo di avere s soggetti e t osservazioni del fenomeno, nel caso in esame, la stima di un dato parametro.

⁴Spesso, si descrive il valore assunto da un elemento della popolazione come $y = \mu + \sigma + \varepsilon$, dove μ è la media generale sui campioni, σ è l'effetto dovuto al trattamento e ε è la componente residua, un errore casuale dovuto al soggetto.

Si definiscono quindi la media dei soggetti nei trattamenti e la media delle risposte dei soggetti ai trattamenti come:

$$\bar{S}_s = \frac{\sum_t X_{ts}}{m}, \quad \bar{T}_s = \frac{\sum_s X_{ts}}{n} \quad (2.16)$$

Dove m ed n sono rispettivamente il numero di trattamenti (nel caso in esame, la somministrazione del pasto in orari diversi) e il numero di soggetti in studio.

Si definisce quindi la varianza totale come:

$$\bar{X} = \frac{\sum_t \sum_s X_{ts}}{nm} \quad (2.17)$$

E la somma totale dei quadrati delle differenze di tutte le osservazioni è:

$$SS_{tot} = \sum_s \sum_t (X_{ts} - \bar{X})^2 \quad (2.18)$$

Tale somma di quadrati è associata a $GL_{tot} = nm - 1$ gradi di libertà.

Supponiamo quindi di suddividere la variabilità totale S_{tot} in due componenti: la variabilità tra soggetti $SS_{tra-soggetti}$ e la variabilità entro i soggetti $SS_{entro-soggetti}$. Quest'ultima racchiude al suo interno la variabilità tra i trattamenti e la variabilità residua.

La $SS_{entro-soggetti}$ e la $SS_{tra-soggetti}$ sono definite come:

$$SS_{entro-soggetti} = \sum_s \sum_t (X_{ts} - \bar{S}_s)^2 \quad SS_{tra-soggetti} = m \sum_s (\bar{S}_s - \bar{X})^2 \quad (2.19)$$

A tali variabilità sono associati, in genere, $GL_{entro} = n(m - 1)$ e $GL_{tra-soggetti} = (n - 1)$ gradi di libertà rispettivamente.

Ora si vuole distinguere il contributo della variabilità dovuta al trattamento dal contributo della variabilità dovuta alla risposta del soggetto nella $SS_{entro-soggetti}$. Si definisce:

$$SS_{trat} = n \sum_s (\bar{T}_s - \bar{X})^2 \quad (2.20)$$

E tale variabilità è associata a $GL_{trat} = (m - 1)$ gradi di libertà. Infine, poiché la somma della variabilità dovuta al trattamento e la residua è pari alla la variabilità entro i soggetti, è possibile calcolare la variabilità residua e i suoi gradi di libertà per differenza tra le quantità precedentemente calcolate:

$$SS_{res} = SS_{entro-soggetti} - SS_{trat} \quad GL_{res} = GL_{entro-soggetti} - GL_{trat} = (n - 1)(m - 1) \quad (2.21)$$

A questo punto, le stime della varianza della popolazione sulla base dei trattamenti e dei residui sono rispettivamente:

$$MS_{trat} = \frac{SS_{trat}}{GL_{trat}} \quad MS_{res} = \frac{SS_{res}}{GL_{res}} \quad (2.22)$$

Infine, è possibile calcolare:

$$F = \frac{MS_{trat}}{MS_{res}} \quad (2.23)$$

per verificare se i trattamenti non hanno alcun effetto sui soggetti sottoposti all'esperimento.

Nel presente studio, questo significa determinare se l'orario del giorno e il quadro fisiopatologico dei soggetti incidono sulla stima dei parametri.

Il risultato del test ANOVA, in termini di probabilistici, viene interpretato alla luce del *p-value*.

Al valore di F viene associato un valore di *p-value* che quantifica la probabilità di ottenere il dato valore di F . In altre parole, asserire che $p < 0.05$ per una data F significa che, se l'ipotesi originaria (non esiste differenza tra i soggetti e i trattamenti) fosse verificata, la possibilità di trovare un valore di F maggiore o uguale a quello determinato è del 5%.

2.5.2 Test di Student

Quando si vogliono determinare le differenze nella media tra due gruppi di eventi, nel caso in esame tra due diverse stime dei parametri, è possibile ricorrere al *t-test* [12].

Tale test prevede il calcolo del valore t come il rapporto tra la differenza delle medie dei campioni e l'errore standard sulla media stessa, ossia la deviazione standard della popolazione di tutte le possibili medie di campioni di numerosità n . In altre parole, si va a calcolare il rapporto tra la differenza nella media del parametro in esame e la deviazione standard dei valori assunti dal parametro nei due gruppi in esame.

In definitiva, il *t-test* viene definito come:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{S_{\bar{X}_1}^2 + S_{\bar{X}_2}^2}} \quad (2.24)$$

Il risultato del test non dipende *esclusivamente* dall'eventuale differenza tra le medie dei due gruppi, ma anche dai particolari elementi selezionati per formare i campioni. Perciò si rende di nuovo necessario attribuire al valore di t calcolato un valore di *p-value* che, come nel caso precedente, permette di quantificare la probabilità di ottenere un valore di t maggiore o uguale a quello calcolato, quando si verifica l'ipotesi originaria (non sussiste differenza tra i gruppi). In conclusione, verrà assunta come verificata l'ipotesi di differenza tra i gruppi nella misura in

cui il p -value fosse minore del 5% e di conseguenza t sufficientemente grande.

Capitolo 3

Risultati

3.1 Confronti tra le diverse implementazioni

I sette modelli implementati sono stati confrontati sulla base dei risultati di *CV*, *WRSS* e *bianchezza dei residui*. Raccolti quindi i dati medi relativi ai valori dei parametri e dei CV, la somma dei residui pesati (completa della loro varianza) e la proprietà di bianchezza dei residui dei modelli in esame, si è scelta la configurazione che presenta la miglior combinazione tra questi tre indici di confronto.

In tabella si riporta una rapida descrizione di quelli che sono gli esiti dei confronti sia per soggetti sani che per soggetti affetti da diabete di tipo 2. Si ricorda che i primi quattro modelli sono stati implementati con l'ipotesi di ingresso impulsivo mentre i restanti con l'ipotesi di ingresso a rettangolo.

Colazione				Pranzo				Cena			
Modello	Bianchezza	WRSS	CV medi	Modello	Bianchezza	WRSS	CV medi	Modello	Bianchezza	WRSS	CV medi
1	No	7.8459	18.17%	1	No	35.81	16.28%	1	No	37.89	18.94%
2	No	6.1798	27.32%	2	No	18.20	>100%	2	No	17.98	51.90%
3	Sì	5.4761	>100%	3	Sì	14.53	43.21%	3	No	21.05	42.95%
4	Sì	5.9022	>100%	4	Sì	14.19	43.21%	4	Sì	39.86	42.95%
5	No	6.3388	20.98%	5	No	13.72	>100%	5	No	16.71	>100%
6	Sì	5.8034	>100%	6	Sì	13.32	30.35%	6	No	20.89	85.28%
7	Sì	5.7792	24.54%	7	Sì	14.38	82.05%	7	Sì	18.87	80.94%

Tabella 3.1: Confronto tra le configurazioni dei modelli per soggetti sani

Come si nota dalla tabella [3.1](#), la settima configurazione del modello presenta il miglior compromesso tra la proprietà di *bianchezza dei residui* e i valori dei CV. A questi, si aggiunge un valore dei *WRSS* piuttosto contenuto, indice di una discreta aderenza tra la curva predetta dal modello e i dati sperimentali.

Un'analoga conclusione, come si evince dalla tabella [3.2](#), si può trarre anche per la settima

Colazione				Pranzo				Cena			
Modello	Bianchezza	WRSS	CV medi	Modello	Bianchezza	WRSS	CV medi	Modello	Bianchezza	WRSS	CV medi
1	No	52.97	16.28%	1	No	46.55	36.73%	1	Sì	36.82	32.89%
2	No	25.57	>100%	2	No	17.67	>100%	2	No	14.10	61.54%
3	No	22.42	44.56%	3	No	14.01	>100%	3	Sì	12.47	50.82%
4	Sì	42.26	>100%	4	Sì	21.73	>100%	4	Sì	11.82	>100%
5	No	19.21	30.51%	5	Sì	15.34	>100%	5	No	11.62	29.15%
6	Sì	22.43	55.97%	6	Sì	14.06	>100%	6	Sì	12.44	>100%
7	Sì	18.82	76.59%	7	Sì	52.20	55.49%	7	Sì	12.50	38.78%

Tabella 3.2: Confronto tra le configurazioni dei modelli per soggetti affetti da diabete di tipo 2

configurazione del modello nel caso di soggetti affetti da diabete di tipo 2.

Pertanto, si è scelto di proseguire utilizzando questa particolare conformazione, la quale assume che l'ingresso sia un rettangolo di ampiezza pari a cinque minuti e non tiene in considerazione i dati relativi ai minuti 10 e 15.

Le tabelle 3.3 e 3.4 mostrano i risultati complessivi per il modello scelto.

Bianchezza	WRSS	SD wrss	Parametri medi		CV medi parametri
Colazione					
Sì	10.12	5.77	Kmax	0.041	14.34%
			Kmin	0.014	38.35%
			Kabs	0.69	18.29%
			b	0.78	35.43%
			c	0.10	16.30%
Pranzo					
Sì	14.38	11.09	Kmax	0.026	8.31%
			Kmin	0.015	34.07%
			Kabs	0.18	23.15%
			b	0.54	3.03%
			c	0.12	41.04%
Cena					
Sì	18.87	6.44	Kmax	0.025	7.01%
			Kmin	0.014	53.25%
			Kabs	0.19	20.19%
			b	0.52	2.79%
			c	0.12	44.98%

Tabella 3.3: Soggetti sani: risultati complessivi per il modello selezionato

Le tabelle 3.3 e 3.4 permettono di comprendere perché si è giunti alla scelta di questa particolare configurazione del modello. Come anticipato infatti, i valori dei WRSS e dei CV sono accettabili e questo risultato si accompagna a una buona bianchezza nella stima.

Nel seguito, si mostrano alcuni grafici relativi all'andamento della curva stimata e al valore dei residui pesati. Si riportano sia i grafici relativi a un particolare soggetto che i risultati complessivi confrontati con la curva dei valori di Ra medi, utile per un confronto visivo tra i dati reali e le predizioni del modello.

Bianchezza	WRSS	SD wrss	Parametri medi		CV medi parametri
Colazione					
Sì	18.82	23.53	Kmax	0.026	7.00%
			Kmin	0.011	18.28%
			Kabs	0.18	21.35%
			b	0.56	45.47%
			c	0.14	28.58%
Pranzo					
Sì	53.20	157.75	Kmax	0.031	74.22%
			Kmin	0.014	1.04%
			Kabs	0.17	22.61%
			b	0.48	18.17%
			c	0.11	65.75%
Cena					
Sì	12.50	8.87	Kmax	0.026	6.31%
			Kmin	0.013	65.92%
			Kabs	0.18	20.23%
			b	0.49	79.35%
			c	0.12	0.22%

Tabella 3.4: Soggetti affetti da diabete di tipo 2: risultati complessivi per il modello selezionato

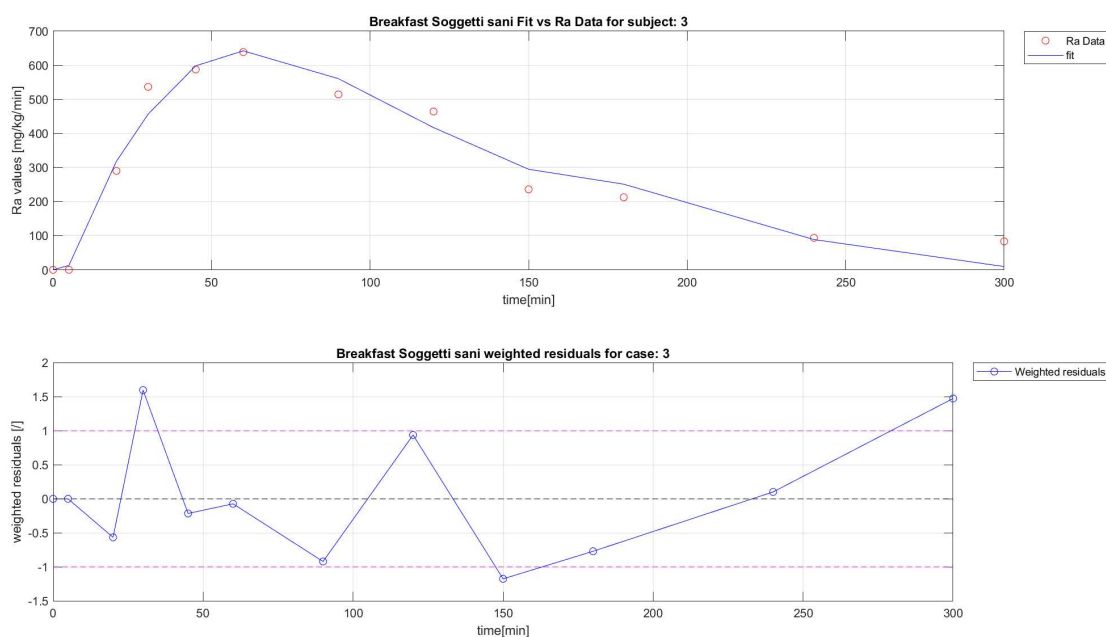


Figura 3.1: Soggetto sano: colazione

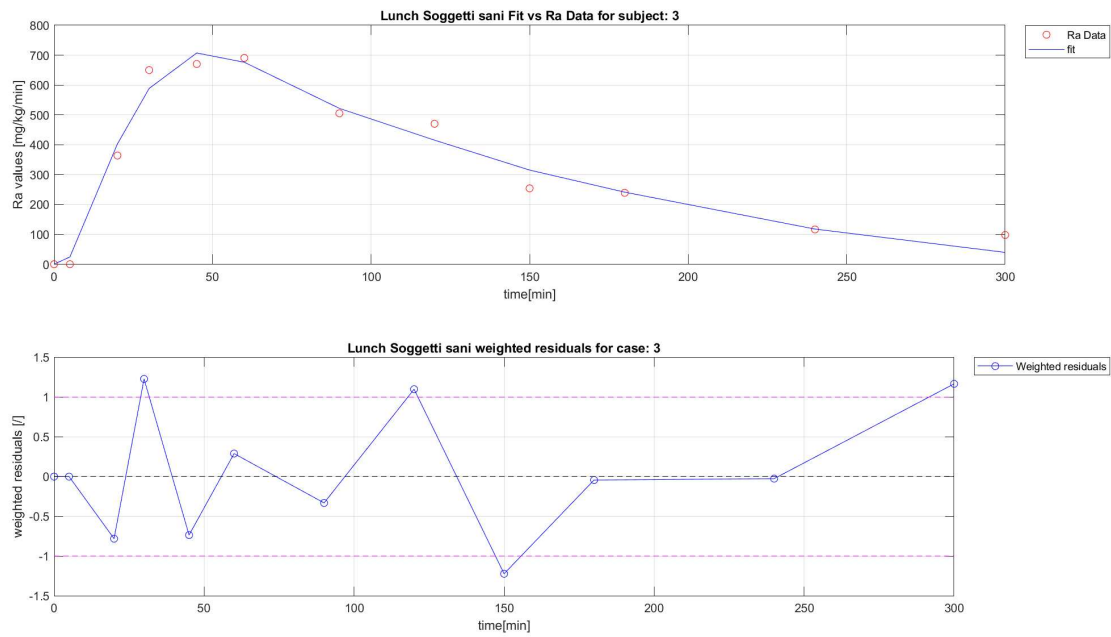


Figura 3.2: Soggetto sano: pranzo

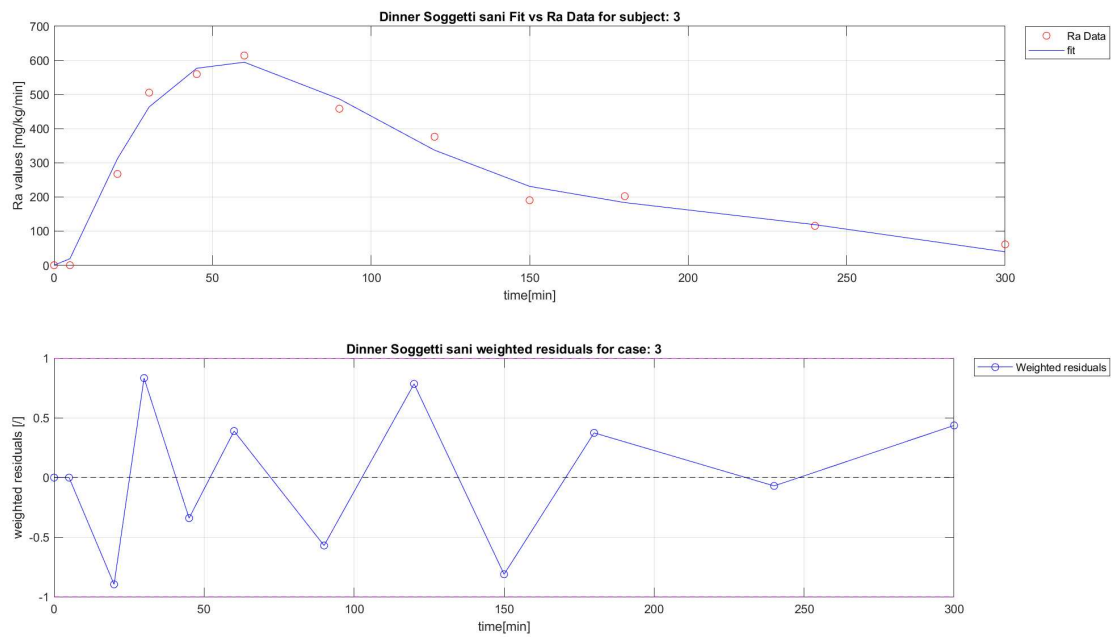


Figura 3.3: Soggetto sano: cena

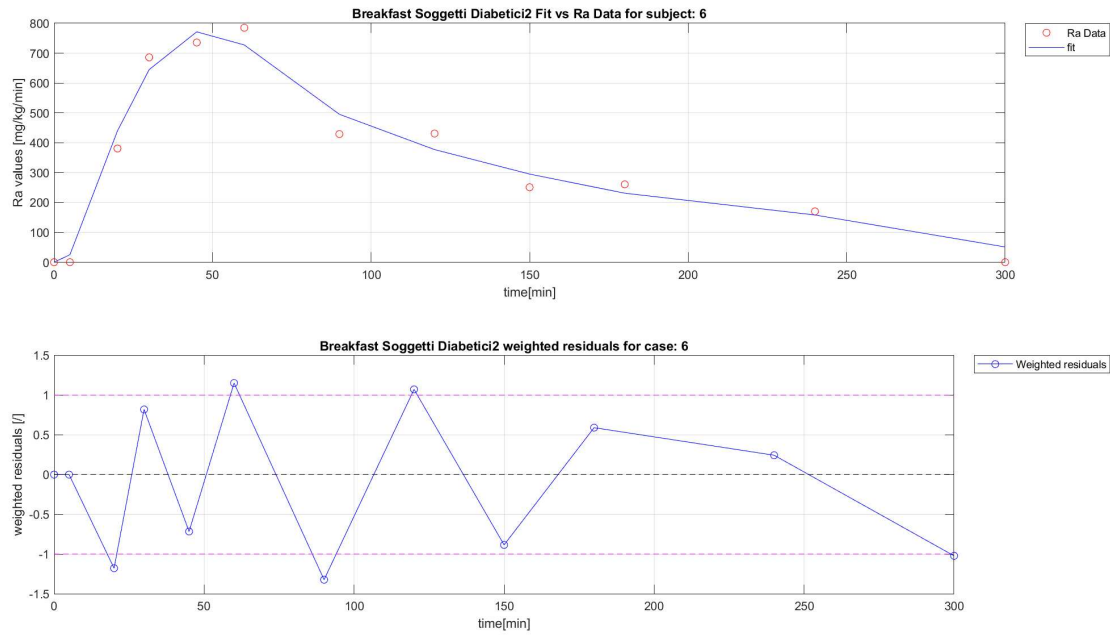


Figura 3.4: Soggetto affetto da diabete di tipo 2: colazione

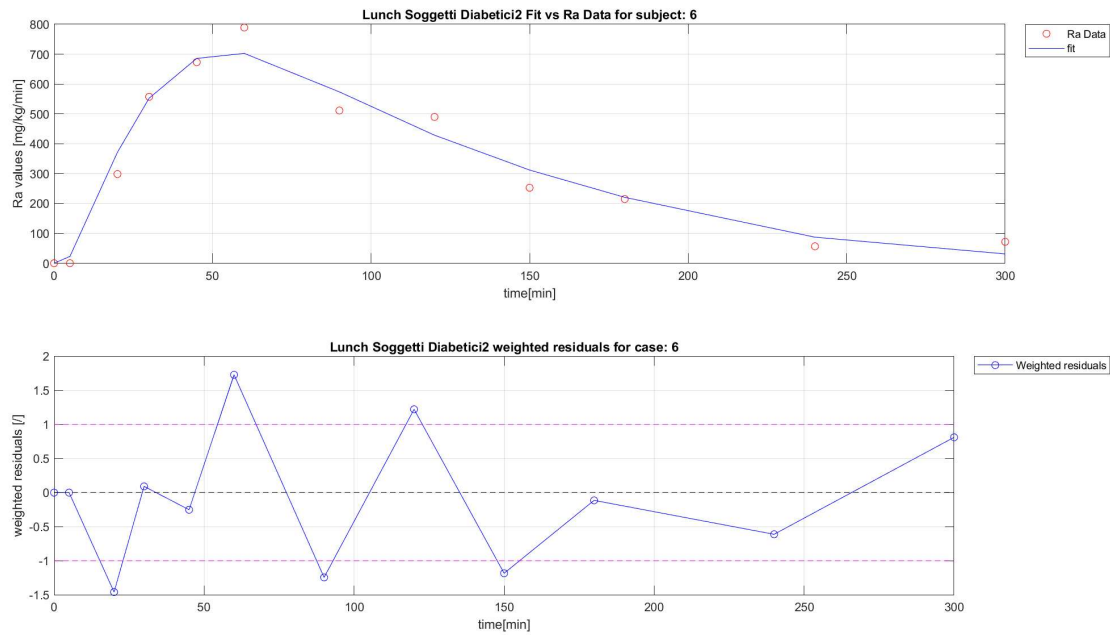


Figura 3.5: Soggetto affetto da diabete di tipo 2: pranzo

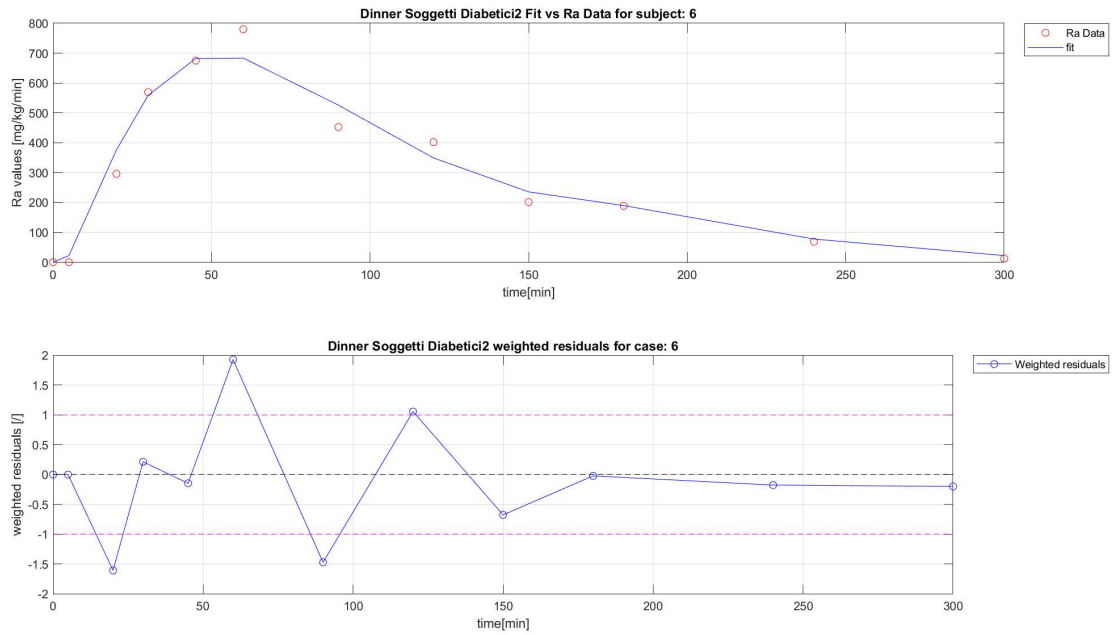


Figura 3.6: Soggetto affetto da diabete di tipo 2: cena

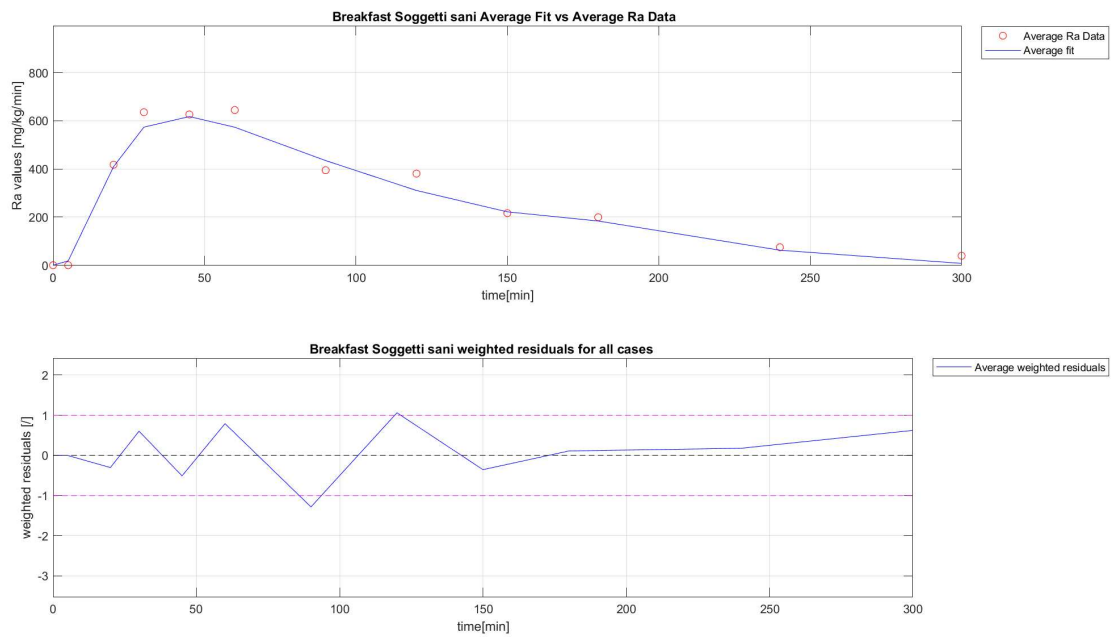


Figura 3.7: Soggetti sani: confronto tra la media della predizione e la media dei dati Ra_{meal}

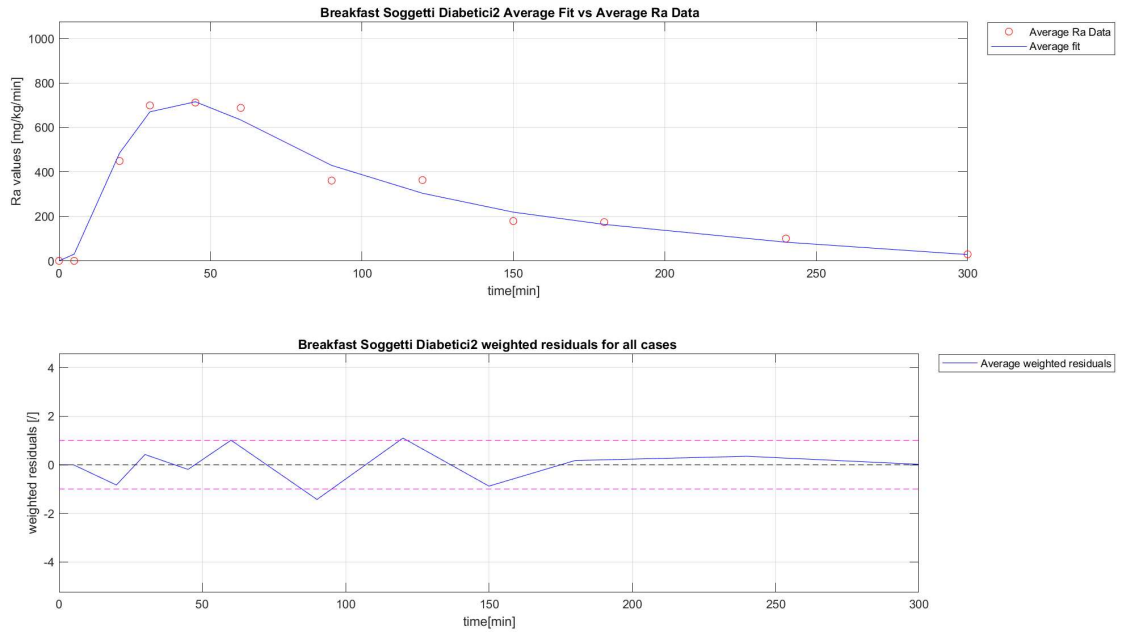


Figura 3.8: Soggetti affetti da diabete di tipo 2: confronto tra la media della predizione e la media dei dati Ra_{meal}

3.2 Risultati dei test statistici

Dopo aver selezionato il modello che meglio descrive i dati, si vuole ricercare quali siano le differenze a livello statistico tra le varie stime dei parametri. Si vuole quindi confrontare il valore dei singoli parametri stimati nelle tre fasce orarie e per le due tipologie di soggetti, cercando eventuali differenze statistiche tra i vari gruppi.

Per farlo si è eseguita l'analisi della varianza per tutti i parametri. Successivamente, per i parametri che hanno mostrato differenze significative, si è eseguito il t-test al fine di identificare per quali gruppi la differenza fosse realmente significativa.

Entrambi i test sono stati eseguiti utilizzando tutti i dati a disposizione, senza avanzare ulteriori ipotesi sulla bontà dei risultati, con particolare riferimento a quei dati che, come si può intuire dai valori medi dei parametri riportati nelle tabelle 3.3 e 3.4, risultano essere outliers¹.

La tabella 3.5 mostra i risultati dell'analisi della varianza. Soffermendosi sui valori assunti dai p -value nei vari casi, assunto un valore di $\alpha = 0.05$, si evince che sussistono differenze significative per quanto riguarda la stima di:

¹Durante l'elaborazione numerica si sono eseguiti i medesimi test eliminando i dati outliers e si sono ottenuti gli stessi risultati

Anova	K_{max}		K_{min}		K_{abs}		B		C	
<i>Sorgente</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>
<i>S-T2</i>	3.2	0.0766	3.57	0.0615	15.08	0.0002	7.8	0.0062	3.57	0.0615
<i>B-L-D</i>	0.64	0.0003	1.87	0.1589	19.98	0	8.21	0.0005	1.87	0.1589

Tabella 3.5: Risultati Anova test per K_{max} , K_{min} , K_{abs} , B e C

- K_{max} nei tre pasti (*Breakfast, Lunch, Dinner*)
- K_{abs} nei tre pasti e tra le tipologie di soggetto (*Sani, Tipo 2*)
- B nei tre pasti e tra le tipologie di soggetto

Si è proseguito pertanto eseguendo dei *t-test* per questi parametri, ricercando quali siano i casi che differiscono dagli altri.

T-TEST									
K_{max}	<i>B vs L (S)</i>	<i>B vs D (S)</i>	<i>D vs L (S)</i>	<i>B vs L (T2)</i>	<i>B vs D (T2)</i>	<i>D vs L (T2)</i>	<i>S vs T2 (B)</i>	<i>S vs T2 (L)</i>	<i>S vs T2 (D)</i>
<i>p Value</i>	3.37E-05	2.88E-05	\	0.044035	\	0.048301	\	\	\
<i>Hp</i>	verificata	verificata	\	verificata	\	verificata	\	\	\
K_{abs}	<i>B vs L (S)</i>	<i>B vs D (S)</i>	<i>D vs L (S)</i>	<i>B vs L (T2)</i>	<i>B vs D (T2)</i>	<i>D vs L (T2)</i>	<i>S vs T2 (B)</i>	<i>S vs T2 (L)</i>	<i>S vs T2 (D)</i>
<i>p Value</i>	5.54E-09	9.68E-12	\	\	\	\	2.65E-09	\	\
<i>Hp</i>	verificata	verificata	\	\	\	\	verificata	\	\
B	<i>B vs L (S)</i>	<i>B vs D (S)</i>	<i>D vs L (S)</i>	<i>B vs L (T2)</i>	<i>B vs D (T2)</i>	<i>D vs L (T2)</i>	<i>S vs T2 (B)</i>	<i>S vs T2 (L)</i>	<i>S vs T2 (D)</i>
<i>p Value</i>	0.000127	0.001884	\	\	\	\	0.002066	\	\
<i>Hp</i>	verificata	verificata	\	\	\	\	verificata	\	\

Tabella 3.6: Risultati del t-test per K_{max} , K_{abs} e B

Il *t-test* ha permesso di determinare che le sussistono differenze nei *soggetti sani* tra la *colazione* e gli altri pasti per tutti e tre i parametri esaminati (prime due colonne della tabella 3.6). Nei *soggetti affetti da diabete di tipo 2* si evidenziano differenze in k_{max} tra la *colazione* e il *pranzo* e tra il *pranzo* e la *cena*. Infine, tra le due tipologie di soggetti sussistono differenze nei valori di k_{abs} e B .

Non si notano nei *soggetti affetti da diabete* le medesime differenze nei tre parametri che sussiste invece nei *soggetti sani*.

I risultati in tabella 3.6 sono resi più chiari dai grafici 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14.

La variabilità dei parametri si riflette in una mancanza di sovrapposizione dei *boxplot*. Questo aspetto è particolarmente evidente per quanto riguarda i valori di k_{max} e k_{abs} stimati per soggetti sani nei tre pasti (grafici 3.9 e 3.10), dove specialmente K_{abs} risulta circa tre volte più piccolo a colazione rispetto al pranzo e alla cena, e per B e k_{abs} tra soggetti sani e affetti da diabete per la colazione (grafici 3.14 e 3.13), dove K_{abs} in particolare risulta essere tre volte più grande nei pazienti diabetici rispetto ai soggetti sani.

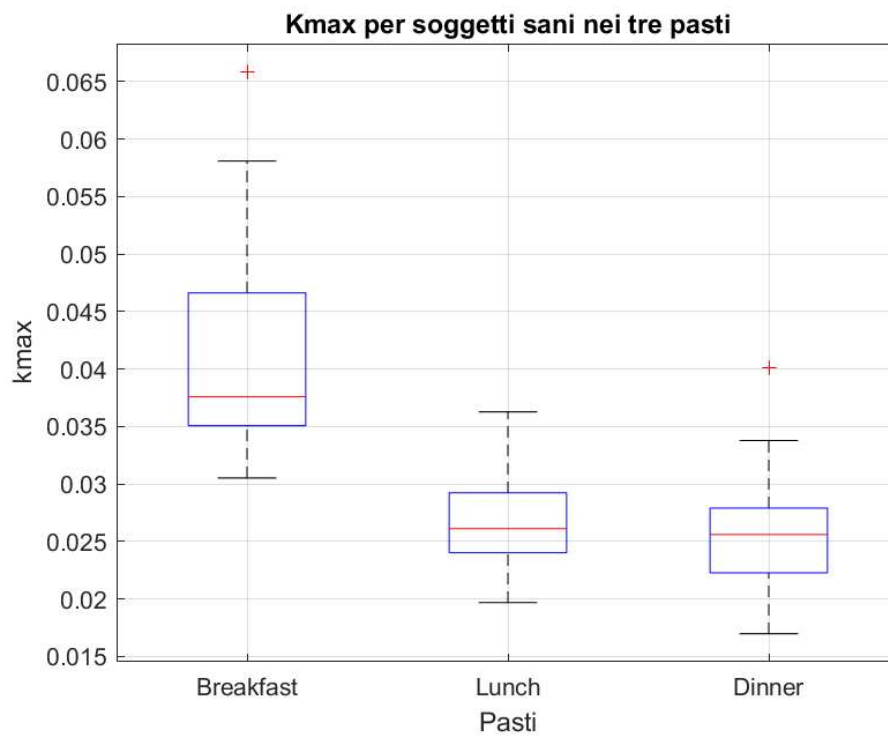


Figura 3.9: Differenze in K_{max} nei tre pasti per soggetti sani

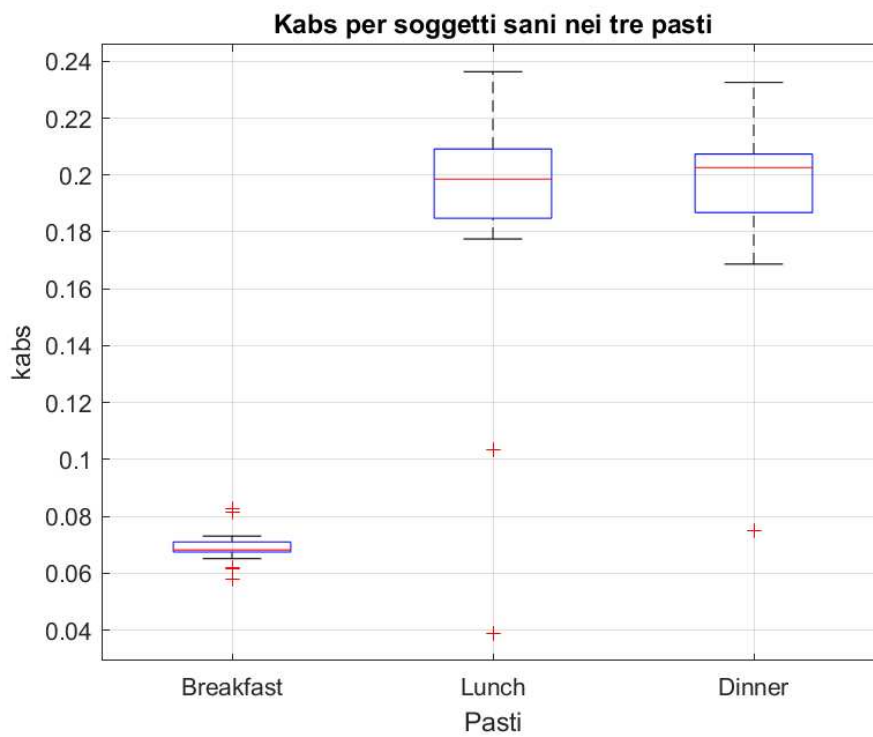


Figura 3.10: Differenze in K_{abs} nei tre pasti per soggetti sani

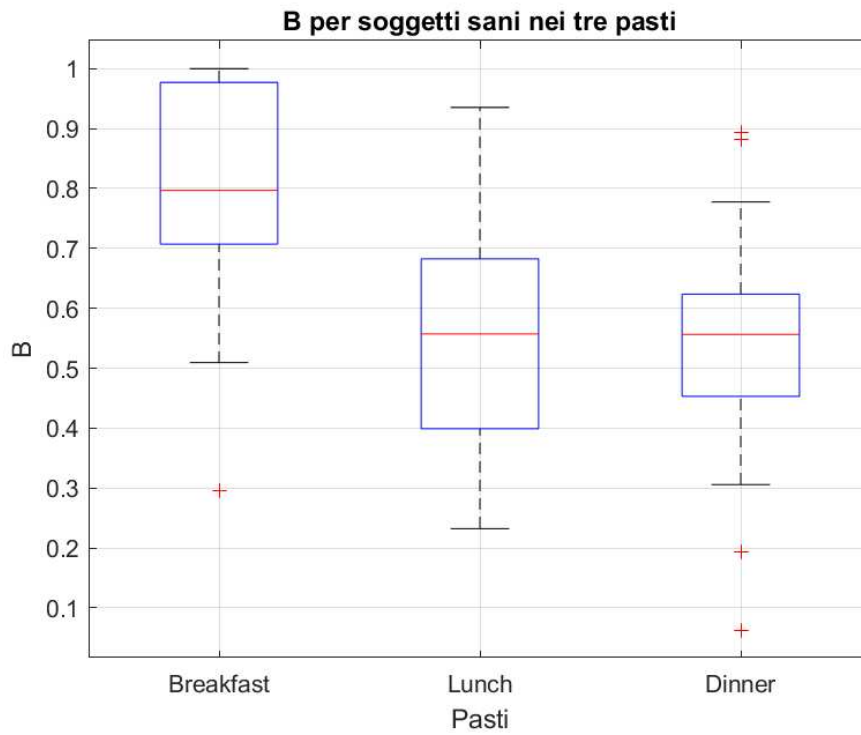


Figura 3.11: Differenze in B nei tre pasti per soggetti sani

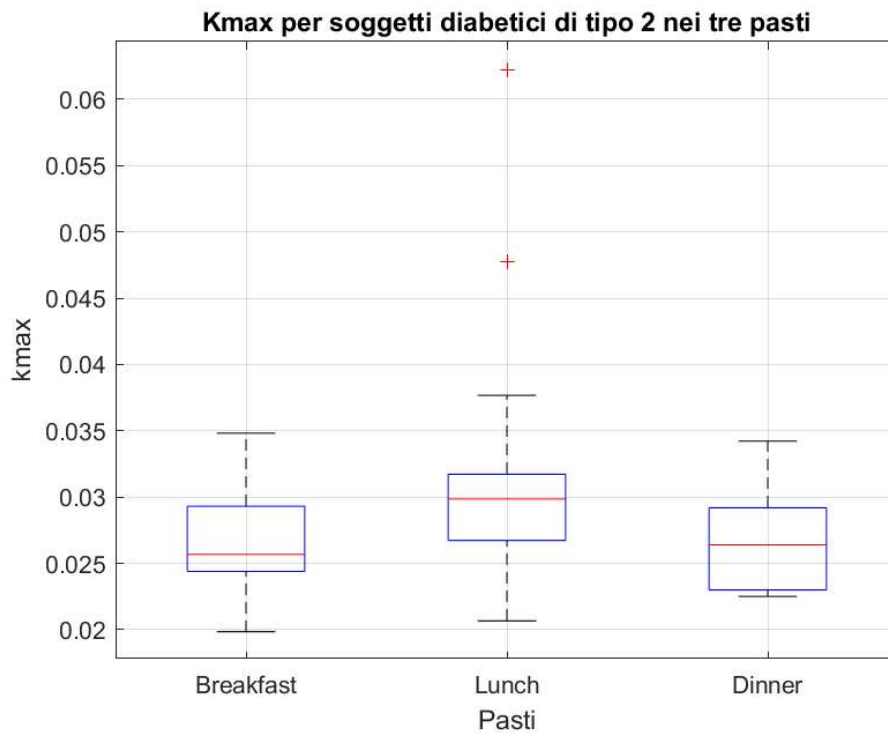


Figura 3.12: Differenze in K_{max} nei tre pasti per soggetti affetti da diabete di tipo 2

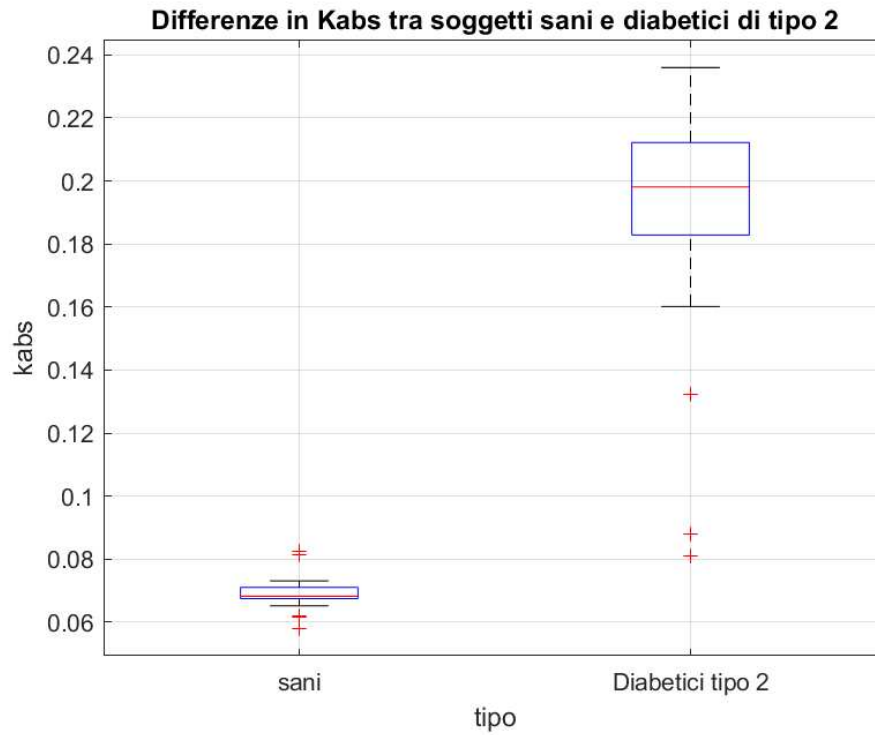


Figura 3.13: Differenze in K_{abs} tra soggetti sani e soggetti affetti da diabete di tipo 2 nella colazione

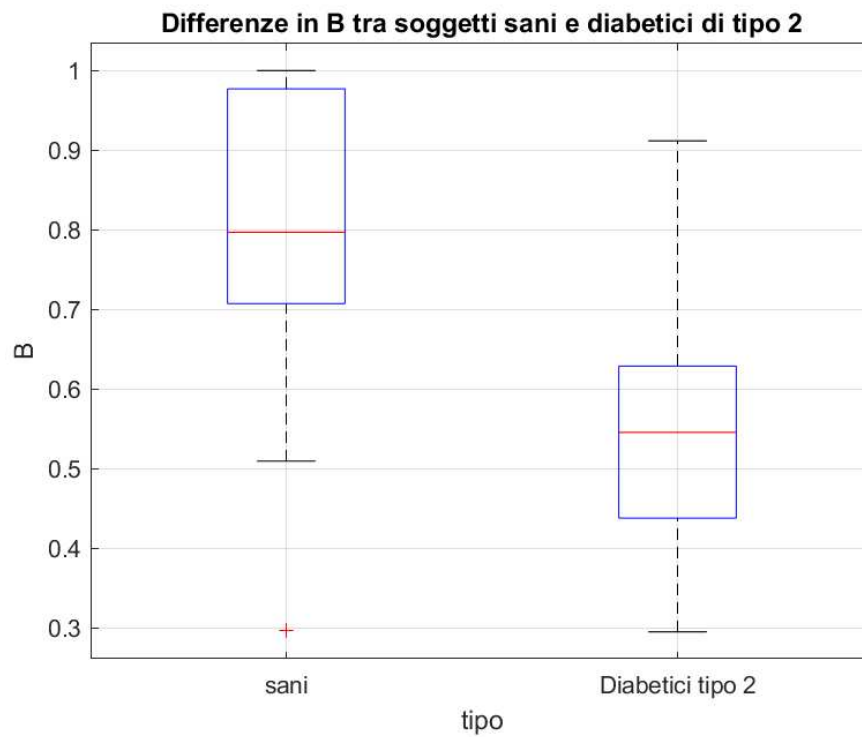


Figura 3.14: Differenze in B tra soggetti sani e soggetti affetti da diabete di tipo 2 nella colazione

Capitolo 4

Discussione

Nel corso dello studio si sono confrontati soggetti sani con soggetti affetti da diabete di tipo 2 al fine di determinare quali siano le differenze tra i due gruppi, nell'arco della giornata, nell'assorbimento del glucosio in seguito ad un ingestione orale di un pasto.

A tale scopo si è utilizzato un modello dell'assorbimento intestinale del glucosio e si sono confrontati i parametri stimati nei diversi gruppi

Il modello è stato inizialmente modificato al fine di poter elaborare correttamente i dati. In particolare, sono state avanzate ed implementate delle ipotesi sulla struttura dei dati e dell'ingresso.

I dati presentavano una serie di valori non validi che andavano gestiti e per farlo si è scelto di non considerare di volta in volta gli istanti temporali corrispondenti. Questo si è ripercosso sul modello con una differente interpolazione lineare dei valori iniziali e pertanto predizioni di volta in volta leggermente diverse. La mancata determinazione dei valori di comparsa del glucosio nella circolazione nei primi istanti temporali potrebbe essere associata a diversi fattori, tra cui valori eccessivamente imprecisi e limiti tecnologici.

L'ingresso ipotizzato dal modello originale, ossia un impulso centrato al primo istante di apparizione del glucosio nel sangue, non rappresenta in modo soddisfacente la realtà. Pertanto, si è implementato un ingresso a gradino di ampiezza pari alla dose di glucosio ingerita e di supporto pari al tempo tra l'istante iniziale e il primo istante di comparsa del glucosio.

A seguito delle diverse ipotesi, si sono teorizzate sette possibili configurazioni del modello e tra esse si è scelta quella che meglio descrivesse i dati in esame. I criteri adottati per la scelta sono stati la bianchezza dei residui, la somma dei residui pesati al quadrato (completa di deviazione

standard) e la precisione di stima dei parametri.

Sia per soggetti sani che per soggetti affetti da diabete di tipo 2, la configurazione che presentava il miglior compromesso tra questi fattori prevedeva un ingresso a rettangolo di supporto pari a cinque minuti. Tale configurazione considerava due soli istanti precedenti alla prima rilevazione del glucosio ematico.

Il fatto che l'ingresso che meglio descrive i dati sia un rettangolo con le caratteristiche presentate può essere interpretato alla luce del fatto che il tempo necessario ai soggetti per ingerire la dose di glucosio è stato di circa 10-15 minuti. Pertanto, considerata la variabilità dei primi valori di Ra_{meal} e il tempo necessario all'ingestione, risulta piuttosto ragionevole che un rettangolo di supporto pari a cinque minuti sia l'ipotesi più accreditata.

Il confronto tra i parametri del modello scelto è stato fatto mediante l'analisi della varianza accoppiata al test di Student. Come risultato, si è dimostrata l'esistenza di una differenza statisticamente apprezzabile nei parametri K_{max}, K_{abs} e b .

K_{max} e b si riferiscono alla velocità di svuotamento dello stomaco K_{empt} . In particolare, K_{max} ne rappresenta il valore massimo mentre b rappresenta la frazione della dose di glucosio dentro lo stomaco per la quale la velocità di svuotamento risulta dimezzata.

K_{abs} invece rappresenta la velocità con la quale il glucosio passa dall'intestino alla circolazione ematica.

K_{max} nei soggetti sani presenta evidenti differenze nella colazione rispetto agli altri pasti della giornata mentre, nel caso di soggetti affetti da diabete, in maniera meno marcata, sussistono discrepanze tra il pranzo e gli altri due pasti.

Similmente, anche per K_{abs} e b si sono evidenziate delle differenze per soggetti sani nella colazione rispetto agli altri pasti, mentre tali differenze non si rilevano per soggetti malati.

Sussistono altresì evidenti differenze tra la stima di K_{abs} e b tra i soggetti sani e i soggetti affetti da diabete.

Le differenze tra i parametri possono essere interpretate ricordando il significato che essi hanno nel modello.

Osservare che K_{max} risulti per qualche pasto (colazione per i soggetti sani, pranzo per i soggetti affetti da diabete) maggiore, potrebbe voler dire che, per il dato pasto, la velocità di passaggio del glucosio dallo stomaco all'intestino ha un valore iniziale mediamente maggiore e

pertanto, in un primo momento, lo stomaco si svuota più rapidamente nel pasto considerato.

A questo risultato, si aggiunge il fatto che b risulti maggiore nella colazione rispetto al pranzo e alla cena, aspetto che potrebbe significare una maggior rapidità di decrescita della velocità di svuotamento dello stomaco in questo momento della giornata. In definitiva, la curva qualitativa di K_{empt} risulta maggiormente spostata verso destra a colazione rispetto agli altri pasti.

La figura 4.1 mostra l'andamento medio del quantitativo di glucosio nello stomaco q_{sto} nei tre pasti per i soggetti sani. La curva relativa alla colazione risulta più bassa rispetto agli altri due pasti, indice di un minor quantitativo di glucosio nel compartimento rispetto agli altri pasti a parità di tempo. L'area ombreggiata indica gli istanti temporali per i quali le differenze risultano essere significative.

Per il parametro K_{abs} dei soggetti sani si può fare un ragionamento simile ma, essendo molto minore a colazione rispetto agli altri due pasti, si potrebbe concludere che in questo pasto ci sia un passaggio più lento del glucosio dall'intestino alla circolazione.

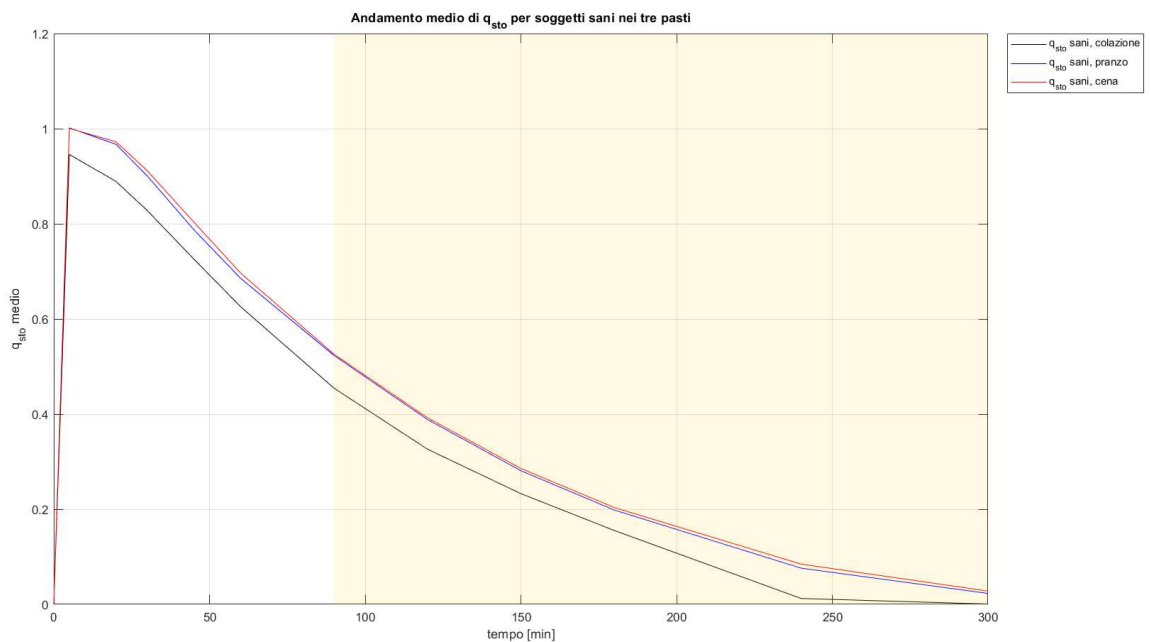


Figura 4.1: Soggetti sani: andamento medio del quantitativo di glucosio q_{sto} nei tre pasti

Per quanto concerne le differenze tra soggetti sani e soggetti affetti da diabete di tipo 2 nei tre pasti, esse si sono riscontrate nella sola colazione. In questo pasto, si potrebbe supporre che i soggetti sani abbiano una curva di decrescita della velocità di svuotamento dello stomaco K_{empt} più ripida rispetto ai soggetti diabetici. Questa deduzione è supportata dal diverso valore di b nei due casi: maggiore per i soggetti sani, minore per i soggetti malati.

La figura 4.2 presenta l'andamento medio del quantitativo di glucosio nello stomaco per i soggetti sani e i soggetti affetti da diabete di tipo 2 nella colazione. La curva relativa ai soggetti sani è minore di quella relativa ai soggetti diabetici, indice di un quantitativo di glucosio nello stomaco minore, a parità di tempo, per i soggetti sani a colazione. L'area ombreggiata indica gli istanti temporali per i quali le differenze risultano essere significative.

Inoltre, anche in questo caso a colazione, K_{abs} risulta minore nei soggetti sani rispetto ai soggetti affetti da diabete. Pertanto, si potrebbe dedurre che il glucosio, per i soggetti normali a colazione, permanga più tempo nell'intestino prima di passare alla circolazione.

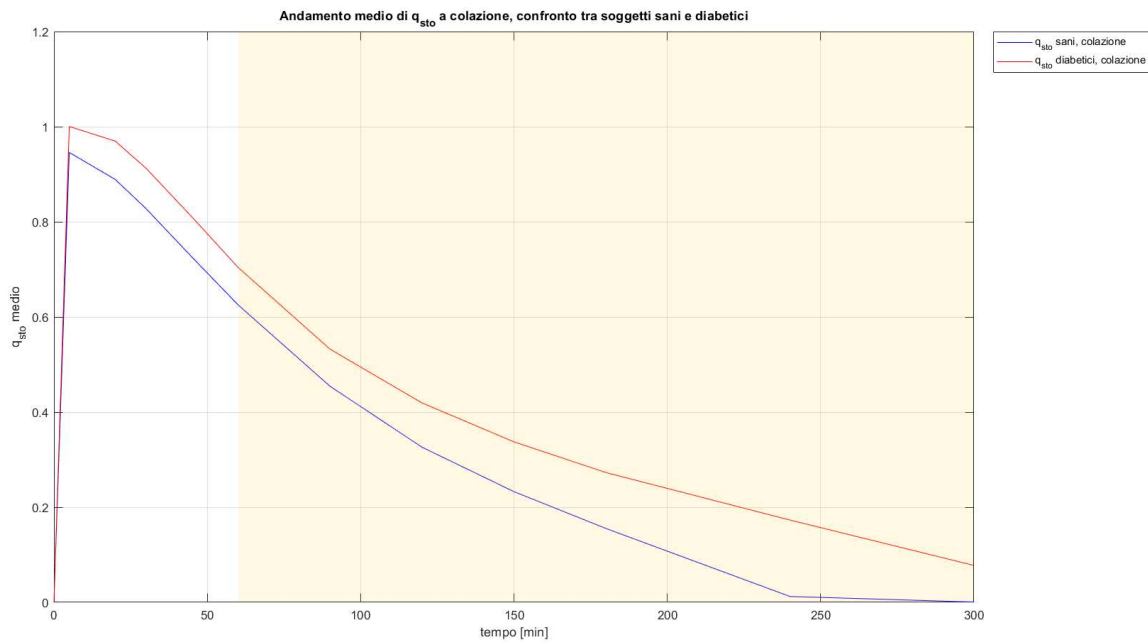


Figura 4.2: Andamento medio del quantitativo di glucosio q_{sto} a colazione per soggetti sani e soggetti affetti da diabete

In conclusione, lo studio ha messo in luce quali siano le caratteristiche che i soggetti sani mostrano nella cinetica del glucosio ematico e quali siano le differenze che si manifestano in essa quando condizionata dalla presenza del diabete di tipo 2. Seppur questi siano risultati insufficienti per concludere quali siano effettivamente le cause dei comportamenti evidenziati, si auspica che futuri studi, anche analoghi, possano confermare le osservazioni e rafforzarne la validità, al fine di raggiungere una sempre maggiore comprensione della fisiopatologia del diabete.

Bibliografia

- [1] Diabete, EpiCentro - Istituto Superiore di Sanità, 2022, www.epicentro.iss.it/diabete/.
- [2] Linda S. Costanzo, *Fisiologia*, p.383, EdiSES, 2001
- [3] Linda S. Costanzo, *Fisiologia*, p.387, EdiSES, 2001
- [4] Linda S. Costanzo, *Fisiologia*, p.389, EdiSES, 2001
- [5] Linda S. Costanzo, *Fisiologia*, p.388, EdiSES, 2001
- [6] Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, Jerrold M. Olefsky, *Diabetes Mellitus, a fundamental and clinical text*, p.544, Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- [7] Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, Jerrold M. Olefsky, *Diabetes Mellitus, a fundamental and clinical text*, p.545, Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- [8] Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, Jerrold M. Olefsky, *Diabetes Mellitus, a fundamental and clinical text*, p.546, Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- [9] Rita Basu, Barbara di Camillo, Gianna Toffolo, Ananda Basu, Pankaj Shah, Adrian Vella, Robert Rizza, Claudio Cobelli, *Use of a novel triple tracer approach to assess postprandial glucose metabolism*, American Journal of Physiology, vol. 284, 2003
- [10] Chiara Dalla Man, Michael Camilleri and Claudio Cobelli, *A system model of oral glucose absorption: validation on gold standard data*, Fellow, 2006.
- [11] Stanton A. Glantz, *Statistica per discipline biomediche*, p.329, McGraw-Hill, 2007.
- [12] Stanton A. Glantz, *Statistica per discipline biomediche*, p.71 McGraw-Hill, 2007.
- [13] Ewart Carson, Claudio Cobelli: *Parameter Estimation, Modelling Methodology for Physiology and Medicine*, Elsevier, 2014.