

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

Connettività funzionale cerebrale alla nascita e sviluppo neurocognitivo a 12 e 24 mesi di età corretta in neonati molto prematuri: uno studio basato sulla spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso

Relatore: Dott.ssa Sabrina Brigadoi

Laureando/a: Elisa De Pietri

Correlatore: Guy Antony Perkins

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 20 ottobre 2023

INDICE

ABSTRACT	1
CAPITOLO 1: L'APPLICAZIONE CLINICA DELLA NIRS NEL CONTESTO DELLA PREMATURITÀ NEONATALE	5
1.1 LA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO (NIRS).....	5
1.1.1 <i>Principi di funzionamento della NIRS</i>	6
1.2 UTILIZZO NEL CONTESTO NEONATALE DELLA NIRS	10
1.2.1 <i>Problematiche associate all'utilizzo nei neonati pretermine</i>	12
1.3 CONNETTIVITÀ FUNZIONALE IN STATO DI RIPOSO	14
1.3.1 <i>Applicazioni in abito neonatale</i>	17
CAPITOLO 2: PREMATURITÀ ED ESITI DELLO SVILUPPO NEUROPSICOLOGICO NEI PRIMI ANNI DI VITA.....	22
2.1 SVILUPPO NEUROPSICOLOGICO NEI BAMBINI NATI PRETERMINE.....	22
2.2 L'ATTENZIONE E IL SUO SVILUPPO NEI BAMBINI PREMATURI	27
2.3 LA MEMORIA DI RICONOSCIMENTO VISIVO E IL SUO SVILUPPO NEI BAMBINI NATI PRETERMINE	30
2.4 VALUTAZIONE DELLO SVILUPPO DI BAMBINI E NEONATI TRAMITE L'IMPIEGO DELLE SCALE BAYLEY III.....	31
2.5 RELAZIONE TRA ATTIVITÀ CEREBRALE E NEUROSVILUPPO NEI NEONATI PREMATURI	34
CAPITOLO 3: SCOPO DELLA TESI E IPOTESI DI RICERCA.....	40
3.1 SCOPO DELLA TESI.....	40
CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI	44
4.1 DATASET	44
4.1.1 <i>Monitoraggio glicemico ed emodinamico alla nascita</i>	46
4.1.2 <i>Follow up a 12 e 24 mesi di età corretta</i>	47
4.2 ANALISI GLICEMICA.....	54
4.2.1 <i>Criteri per l'individuazione degli eventi e l'euglicemia</i>	57
4.2.2 <i>Valutazione dei gap temporali</i>	58
4.3 CRITERI PER L'INCLUSIONE DEI PAZIENTI NELL'ANALISI DEL SEGNALE NIRS.....	59
4.4 ANALISI DEI DATI NIRS.....	61

4.4.1	<i>Selezione della finestra temporale ottimale per l'analisi del segnale NIRS</i>	61
4.4.2	<i>Pipeline di elaborazione del segnale NIRS</i>	72
4.4.3	<i>Ricostruzione delle immagini e selezione delle regioni di interesse</i>	77
4.4.4	<i>Estrazione delle matrici di connettività funzionale</i>	82
4.5	METODI DI CALCOLO DEGLI INDICI DEL NEUROSVILUPPO	83
4.6	CORRELAZIONE TRA LE MATRICI DI CONNETTIVITÀ FUNZIONALE E LE METRICHE DEL NEUROSVILUPPO.....	88
CAPITOLO 5: RISULTATI		92
5.1	RISULTATI DELL'ANALISI GLICEMICA	92
5.1.1	<i>Valutazione della prima finestra di euglicemia</i>	94
5.2	ESITI DELL'ANALISI DEI SEGNALI FNIRS	95
5.2.1	<i>Selezione della finestra temporale ottimale</i>	95
5.2.2	<i>Connettività funzionale</i>	105
5.3	RISULTATI DELLE METRICHE DEL NEUROSVILUPPO	108
5.3.1	<i>Risultati raccolti nel follow-up ai 12 mesi d'età corretta</i>	109
5.3.2	<i>Risultati raccolti nel follow-up ai 24 mesi d'età corretta</i>	111
5.4	RISULTATI DELLA CORRELAZIONE TRA LE MATRICI DI CONNETTIVITÀ FUNZIONALE E LE METRICHE DEL NEUROSVILUPPO.....	112
5.4.1	<i>Risultati per il follow-up a 12 mesi di età corretta</i>	112
5.4.1.1	Indici di sviluppo dell'attenzione.....	113
5.4.1.2	Indici di sviluppo della memoria	115
5.4.1.3	Indici di sviluppo cognitivo, motorio, linguistico e socio-emozionale.....	117
5.4.1.4	Risultati delle correlazioni a gruppi	118
5.4.2	<i>Risultati per il follow-up a 24 mesi di età corretta</i>	121
5.4.2.1	Indici di sviluppo dell'attenzione.....	121
5.4.2.2	Indici di sviluppo della memoria	123
5.4.2.3	Indici di sviluppo cognitivo, motorio, linguistico e socio-emozionale.....	126
5.4.2.4	Risultati delle correlazioni a gruppi	128
DISCUSSIONE.....		132
CONCLUSIONI.....		141
BIBLIOGRAFIA		144

ABSTRACT

I neonati prematuri fin dai primi anni di vita presentano elevati tassi di deficit nello sviluppo cognitivo, linguistico, socio-emotivo e sensorimotorio [1], [2], ma i meccanismi per rilevare queste carenze precocemente rimangono limitati. Sennonché, grazie ai progressi nelle tecniche di neuroimaging, è ora possibile indagare sulla possibilità che vi sia una correlazione tra il rischio di sviluppare deficit neurologici ed i modelli emodinamici funzionali cerebrali presenti alla nascita. Tra le tecniche di neuroimaging disponibili, la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) è una promettente tecnica non invasiva che può essere utilizzata per acquisire i modelli emodinamici a riposo (rs-fNIRS), i quali definiscono l'architettura delle reti funzionali del cervello nei neonati [3].

Il dataset per questo studio comprende 47 neonati molto pretermine, venuti al mondo prima delle 32 settimane di età gestazionale o con un peso alla nascita inferiore ai 1500g, i cui dati emodinamici sono stati raccolti presso l'Unità di Terapia Intensiva Neonatale dell'Ospedale Universitario di Padova nel corso della prima settimana di vita, a partire da marzo 2020. La ricerca si basa su un più ampio progetto sperimentale il cui reclutamento è ancora in corso e prevede un follow-up di questi pazienti ai 12 e 24 mesi di età corretta, al fine di valutare il loro sviluppo cognitivo, motorio, linguistico e socio-emozionale, nonché lo sviluppo di due funzioni cognitive molto importanti, ovvero l'attenzione e la memoria visiva.

I dati fNIRS sono stati acquisiti con un sistema NTS (Gowerlabs) dotato di 8 sorgenti e 8 detettori, per un totale di 64 canali localizzati in specifiche aree cerebrali, tra le quali: parietali, motorie, occipitali superiori, temporali superiori e frontali posteriori; le registrazioni sono state eseguite continuativamente per una durata che va da un minimo di 20 ore a un massimo di 6 giorni dopo la nascita.

In questo studio sono stati coinvolti 24 di questi neonati prematuri, poiché già sottoposti al follow-up a 12 mesi di età corretta, e 18 di questi anche ai 24 mesi, per valutare il loro sviluppo neurologico. Nello specifico, a 12 mesi, lo sviluppo cognitivo, linguistico, motorio e socio-emotivo è stato valutato utilizzando la Scala Bayley III dello Sviluppo del Bambino e del Neonato ed in aggiunta sono stati utilizzati due compiti sperimentali per sottoporre a esame l'attenzione e la memoria di riconoscimento visivo. Il compito Gap-Overlap, per studiare i processi di attenzione, in particolare il disancoraggio e lo spostamento dell'attenzione ed il *Simultaneous Stream Change Detection Task*, per la memoria di riconoscimento visivo, ovvero

la capacità di recuperare una traccia mnemonica memorizzata in precedenza [4], [5]. A 24 mesi è stato effettuato lo stesso follow-up, aumentando la complessità dei test in relazione all'abilità di un bambino di pari età e durante i compiti sperimentali sono stati registrati dati elettroencefalografici ad alta densità, che non verranno discussi in questa tesi.

Lo scopo di questo studio è quello di verificare un eventuale legame tra la connettività funzionale allo stato di riposo alla nascita e gli indici comportamentali, misurati durante i follow-up a 12 e 24 mesi d'età corretta, per delineare precocemente potenziali percorsi di sviluppo utilizzando una valutazione che non richieda procedure invasive.

La connettività funzionale è stata calcolata dai dati fNIRS utilizzando una finestra temporale di 5 minuti identificata durante lo stato di riposo del paziente, ovvero quando non sta svolgendo un compito (condizione sempre ipotizzabile in un neonato di pochi giorni) e dove il segnale fNIRS è il più stabile possibile, con pochi artefatti da movimento e pochi canali rumorosi rimossi. La ricostruzione delle immagini corticali relative all'emodinamica cerebrale, che descrivono le variazioni di deossi e ossiemoglobina, è stata realizzata utilizzando un modello cerebrale neonatale corrispondente all'età gestazionale prematura. Per ridurre la dimensionalità dei dati, le matrici di connettività funzionale sono state calcolate su un piccolo numero di regioni di interesse, in grado di cogliere e descrivere l'attività cerebrale neonatale [3].

Le metriche derivate dall'analisi rs-fNIRS sono poi state correlate con gli indici comportamentali misurati durante i follow-up per tracciare possibili traiettorie di sviluppo. I risultati ottenuti da un punto di vista statistico non sono sopravvissuti alla correzione per confronti multipli, probabilmente a causa della ridotta numerosità del campione sperimentale, per cui verranno presentati solo a livello esplorativo quelli emersi prima della correzione.

In questo lavoro di tesi è stato realizzato il codice in grado di processare i dati registrati, analizzarli e correlarli con le metriche dello sviluppo in modo semiautomatico.

I risultati esplorativi emersi mostrano, a 12 mesi d'età corretta, un'associazione tra la connettività nelle aree frontali-motorie e gli indici di sviluppo attentivo. Questa associazione si dissipa ai 24 mesi, e viene sostituita da una associazione tra l'area motoria e parietale e gli indici di sviluppo attentivo. Per quanto riguarda il paradigma che indaga le capacità mnemoniche visive, a 12 mesi d'età corretta, non emergono correlazioni coerenti tra i due cromofori per nessuna coppia di ROI, mentre a 24 mesi si manifestano diverse associazioni tra gli indici mnemonici e la connettività tra l'area motoria e quella frontale. Ciò è coerente con quanto riportato in letteratura, poiché in entrambi i paradigmi, le aree frontali e parietali dimostrano

un'elevata attività durante l'esecuzione di questi compiti, dato che sottendono rispettivamente al controllo esecutivo e al controllo dell'attenzione e della memoria [6], [7].

Per quanto concerne le valutazioni effettuate mediante le scale Bayley III, si evidenziano promettenti associazioni tra l'area parietale a 12 mesi d'età corretta e l'area frontale a 24 mesi e gli indici di sviluppo del linguaggio, che è strettamente legato alle abilità attentive e mnemoniche, confermando i risultati riscontrati per tali funzioni cognitive.

I risultati ottenuti sembrano suggerire la presenza di correlazioni tra la connettività cerebrale funzionale alla nascita tra specifiche ROI e alcune misure comportamentali osservate nei bambini a 12 e 24 mesi d'età corretta, specialmente per quanto riguarda l'attenzione e il linguaggio. Ciò indica che la connettività funzionale al momento della nascita potrebbe essere un indicatore precoce in grado di predire lo sviluppo futuro delle capacità cognitive e dell'attenzione nei bambini, ma sono necessari studi su campioni più ampi e analisi causali per confermare tali associazioni.

CAPITOLO 1: L'APPLICAZIONE CLINICA DELLA NIRS NEL CONTESTO DELLA PREMATURITÀ NEONATALE

1.1 La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS)

La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS) è una tecnica di neuroimaging che sfrutta le proprietà della luce rossa e nel vicino infrarosso: i tessuti biologici sono trasparenti alla luce a queste lunghezze d'onda, mentre le due molecole di interesse, l'emoglobina ossigenata e quella deossigenata, la assorbono in maniera specifica.

La luce interagisce con la materia tramite due meccanismi fondamentali: l'assorbimento e la dispersione; nel primo caso l'energia del fotone viene assorbita dal mezzo e dissipata (solitamente sotto forma di calore) il che significa che il percorso seguito dal fotone non diverge, ma è sempre unidirezionale. Nella seconda interazione tra la luce e la materia invece, l'energia del fotone rimane invariata, ma esso viene deviato in direzione differente in modo randomico. La probabilità che si verifichino questi due fenomeni dipende da due specifici coefficienti, uno riferito all'assorbimento (μ_a) e l'altro alla dispersione (μ_s), che variano al variare del tessuto e della lunghezza d'onda della luce incidente e rappresentano l'inverso della distanza media percorsa dal fotone all'interno del materiale prima di essere assorbito o deviato.

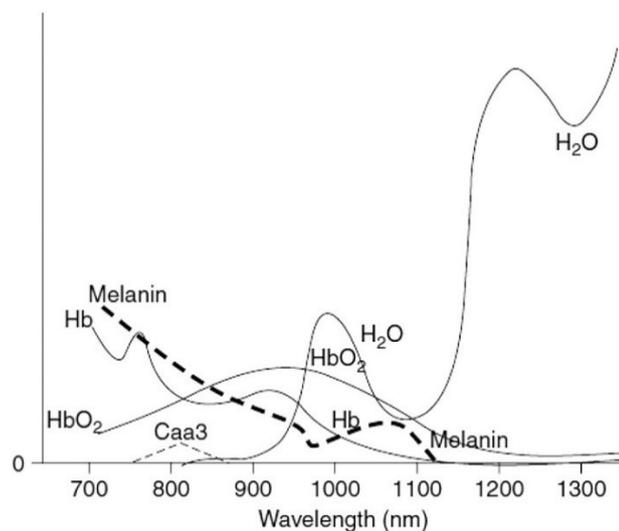


Figura 1: "Spettri di assorbimento per emoglobina ossigenata (HbO₂), emoglobina deossigenata (Hb), Caa3, melanina e acqua (H₂O) nel range di lunghezze d'onda nella gamma NIRS." Preso da [8].

Nella porzione dello spettro elettromagnetico di interesse, che va dai 650nm ai 900nm (approssimativamente), l'acqua, che è la principale componente del nostro corpo, presenta un'assorbanza molto bassa, non assorbendo in modo significativo questa gamma di lunghezze d'onda, a differenza di due cromofori, l'emoglobina deossigenata (HbR) e ossigenata (HbO), che sono i principali assorbitori di luce in questo range (Figura 1) [9].

1.1.1 Principi di funzionamento della NIRS

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) è una tecnica di imaging cerebrale non invasiva che viene impiegata nella misurazione delle variazioni dei livelli di ossigeno nel sangue, durante stati di attivazione cerebrale o a riposo, misurando le variazioni di concentrazione dell'emoglobina nelle sue due forme. È in grado di misurare le modificazioni delle concentrazioni di deossi e ossiemoglobina che si verificano durante l'attività neuronale, grazie all'incremento della domanda metabolica, la quale porta a vasodilatazione e perciò ad un aumento del flusso sanguigno, con conseguente innalzamento della concentrazione di HbO e abbassamento di HbR (vedi Figura 2).

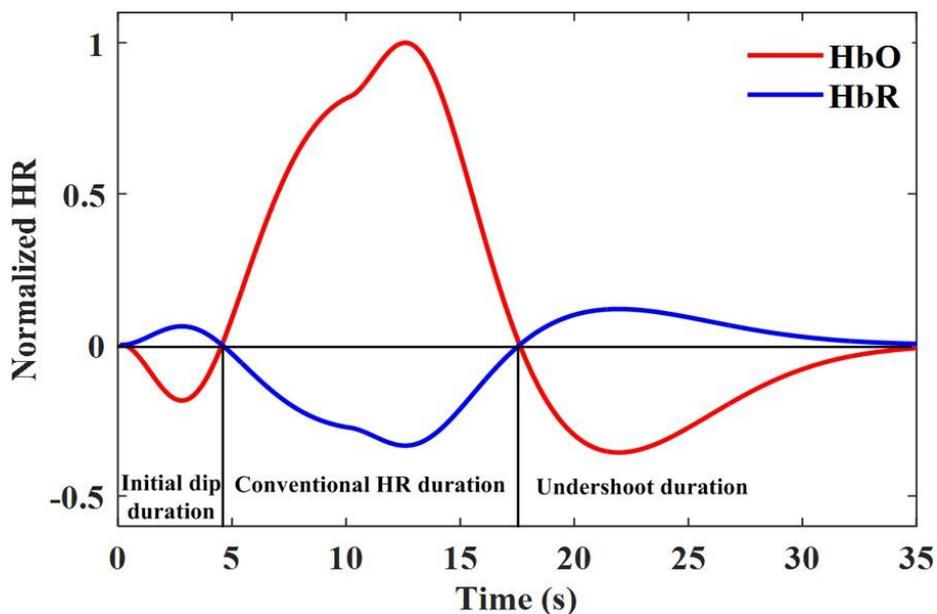


Figura 2: Variazione nelle concentrazioni di HbO e HbR in una tipica risposta emodinamica (HR). Preso da [10].

La fNIRS necessita di una sorgente di luce, diretta nel cuoio capelluto e di un detettore o rilevatore che la rileva in un secondo punto sullo scalpo; un detettore e una sorgente formano un canale.

Le due interazioni tra luce e tessuto non hanno la stessa probabilità di avvenire a livello cerebrale, in quanto la dispersione è il meccanismo che domina la propagazione ed è a circa 100 volte più probabile del fenomeno di assorbimento. Per questo motivo il fascio luminoso che attraversa i tessuti viene considerato diffuso.

La differenza tra l'intensità della luce incidente I_{in} emessa dalla sorgente e quella in uscita I_{out} misurata dal rilevatore, in un sistema fNIRS a luce continua, è dovuta principalmente alla quantità d'ossigeno legato all'emoglobina, presente nel tessuto attraversato. Utilizzando la legge di Beer-Lambert modificata è possibile mettere in relazione queste due intensità come segue:

$$\frac{I_{out}}{I_{in}} = e^{-x\mu_a} + \text{perdite}$$

dove per x si intende la distanza tra detettore e sorgente percorsa dalla luce e le perdite rappresentano i fotoni non misurati dal rilevatore. Entrambe queste variabili sono delle incognite legate alla dispersione, ovvero l'interazione dominante tra tessuto e luce; nello specifico il fotone si muove in modo casuale dalla sorgente all'interno del tessuto, impedendo la stima della perdita nel rilevamento a livello dello specifico detettore o dell'eventuale distanza percorsa tra sorgente e quest'ultimo. Inoltre, l'intensità di luce incidente a livello dei tessuti dello scalpo non è nota a priori in quanto in parte verrà assorbita dai capelli.

Nel caso della fNIRS, la variabile μ_a dipende dai tessuti attraversati, dal loro spettro d'assorbimento e dalla concentrazione di assorbenti di questa luce al loro interno. μ_a può essere espressa quindi come la somma delle concentrazioni dei componenti presenti nei diversi tessuti, moltiplicati per il loro coefficiente di assorbimento specifico a quella lunghezza d'onda. Negli esperimenti in vivo queste concentrazioni rappresentano delle incognite.

Per poter effettuare una stima del coefficiente di assorbimento è necessario diminuire il numero delle incognite sulla base di alcune assunzioni:

- μ_a varia nel tempo, perciò è possibile misurare le variazioni anziché i valori assoluti. Il valore assoluto del coefficiente di assorbimento è in grado di stimare la concentrazione, in valore assoluto, dei differenti cromofori presenti nei tessuti, ma con questa assunzione è possibile calcolare solamente i cambiamenti, tra due punti temporali, delle concentrazioni delle componenti presenti. Questo concetto viene spiegato matematicamente nella formula seguente:

$$\ln\left(\frac{I_2}{I_{in}}\right) - \ln\left(\frac{I_1}{I_{in}}\right) = \ln\left(\frac{I_2}{I_1}\right) = -x * \Delta\mu_a$$

tenendo presente che I_2 e I_1 sono le intensità in output, riferite allo stesso rilevatore in due istanti temporali differenti e considerando l'intensità in input e le perdite invariate tra questi due tempi è possibile eliminarle come incognite nella risoluzione.

- x è stimabile come il prodotto della distanza tra rilevatore e sorgente per un fattore denominato fattore di differenziazione della lunghezza del percorso (DPF), dipendente dalla lunghezza d'onda e dall'età (pertanto costante tra i due punti temporali), che permette di considerare il pattern casuale del percorso dei fotoni nel tessuto.

Perciò, prendendo atto delle precedenti assunzioni, è possibile stimare $\Delta\mu_a$, il quale risulta linearmente correlato ai cambiamenti di concentrazione dei componenti del materiale a una data lunghezza d'onda:

$$\Delta\mu_{a|\lambda} = \tilde{\mu}_{HbO|\lambda}\Delta C_{HbO} + \tilde{\mu}_{HbR|\lambda}\Delta C_{HbR} + \tilde{\mu}_{H_2O|\lambda}\Delta C_{H_2O} + \tilde{\mu}_{Fat|\lambda}\Delta C_{Fat} + \tilde{\mu}_{Melanin|\lambda}\Delta C_{Melanin} + \dots$$

dove, come detto precedentemente, ma riferito alle concentrazioni assolute, tali variazioni sono incognite, mentre il rispettivo coefficiente di assorbimento è noto a priori.

Considerando che durante un'acquisizione è improbabile che ci siano delle variazioni riguardanti tutti i cromofori, eccetto HbO e HbR, e che il coefficiente di assorbimento dell'acqua assuma valori relativamente bassi nell'intervallo NIRS considerato, è possibile trascurare il contributo di tutti i cromofori tranne che HbO e HbR. Tramite una misurazione concomitante temporalmente e spazialmente, eseguita ad almeno due lunghezze d'onda, è possibile stimare le variazioni di concentrazione di deossi- e ossiemoglobina separatamente. Solitamente vengono impiegate due lunghezze d'onda (780nm e 850nm): una al di sotto e una

al di sopra del punto isosbestico, osservabile nello spettro di assorbimento come l'intersezione tra le curve di HbO e HbR (Figura 1), a circa 800nm; la motivazione risiede in una più elevata sensibilità all'emoglobina deossigenata per lunghezze d'onda inferiori e all'ossiemoglobina per quelle superiori.

Il monitoraggio dell'attività cerebrale richiede per tanto, il posizionamento sullo scalpo di un optodo con funzione di sorgente luminosa co-localizzata per due lunghezze d'onda e di un rilevatore in grado di misurare la luce retrodiffusa in superficie, a pochi centimetri dalla sorgente, per la stima delle variazioni di HbO e HbR nell'area coperta che, approssimativamente, assume una forma definibile "a banana" (Figura 3). Tale forma è descritta dalla funzione di densità di misurazione dei fotoni (PMDF), che usando approcci probabilistici, descrive la propagazione dei fotoni nei tessuti biologici. Questa funzione fornisce la probabilità che un fotone rilevato sia transitato attraverso una data regione tissutale e perciò, all'aumentare della probabilità corrisponde un aumento della sensibilità della acquisizione ai cambiamenti nelle proprietà ottiche nella specifica area coperta. La separazione tra sorgente e rilevatore cerca di massimizzare la sensibilità al tessuto cerebrale, aumentando la profondità che i fotoni possono raggiungere per essere rilevati dallo specifico detettore, ma, al contempo, rilevando sufficiente luce in modo da garantire misurazioni affidabili. All'aumentare della distanza l'intensità ottica rilevata diminuirà così come il rapporto segnale-rumore [9].

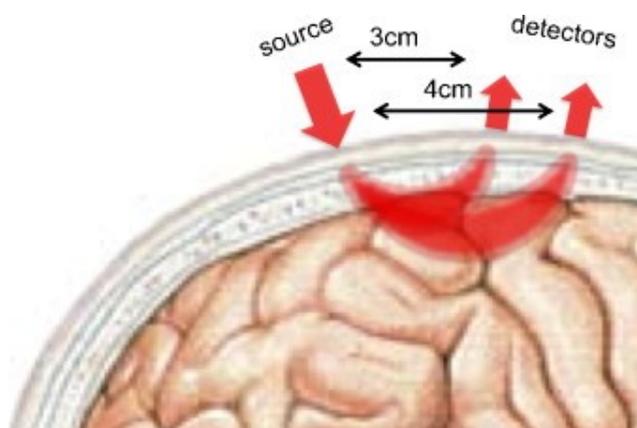


Figura 3: Traiettoria della luce, dalla sorgente al rilevatore, in un'acquisizione fNIRS. Preso da [11].

1.2 Utilizzo nel contesto neonatale della NIRS

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso è una tecnica di imaging cerebrale particolarmente adatta all'applicazione neonatale, in quanto non invasiva, non necessita che i soggetti rimangano immobili per periodi prolungati ed è facilmente applicabile senza il trasporto in strutture specializzate (Figura 4). Questo la rende un metodo ottimale per l'utilizzo in terapie intensive neonatali [11]–[13]. Inoltre, è silenziosa, sicura (non impiega campi magnetici forti, impulsi di radiofrequenza o traccianti [11]) e possiede una risoluzione spaziale (di circa 2-3 cm) migliore rispetto all'EEG, ma inferiore all'fMRI e alla PET.



Figura 4: Esempio di cuffia per l'acquisizione DOT applicata ad un neonato. Presa da [8].

La tomografia ottica diffusa o DOT integra i dati provenienti da acquisizioni fNIRS multicanale al fine di estendere la copertura della corteccia cerebrale, permettendo di ricostruire delle immagini della variazione dell'emodinamica paragonabili a quelle ottenute tramite risonanza magnetica, sfruttando un atlante o una risonanza magnetica anatomica individuale per le informazioni strutturali [14] (vedi Figura 5). Nei neonati le distanze tra sorgente e detettore sono tra i 20-25mm; dato il poco spessore del cranio, questi canali raggiungono una profondità di circa 3cm e perciò, sono in grado di registrare l'attività a livello corticale situata a circa 1,5cm dalla superficie [13], a differenza degli adulti dove questa acquisizione registra l'attività corticale per uno spessore di 3-5mm [11].

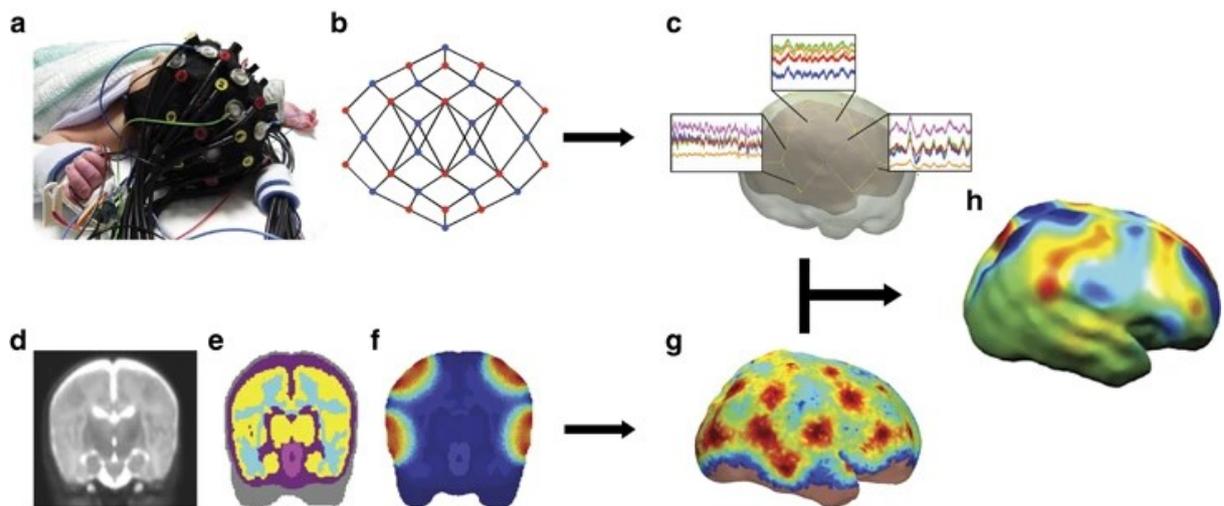


Figura 5: a) cuffia utilizzata per l'acquisizione; b) disposizione spaziale delle sorgenti e dei detettori e dei canali corrispondenti; c) segnali fNIRS in termini di intensità luminosa vengono convertiti in densità ottica; d) esempio di atlante o risonanza magnetica eseguita sul paziente per le informazioni strutturali; e) assegnazione delle diverse tipologie di tessuto sull'immagine anatomica; f) modello matematico che descrive la PMDF; g) matrice di sensibilità specifica per il paziente; h) immagine ricostruita combinando le due tipologie di informazioni. Preso da [14].

Nei neonati, soprattutto pretermine, diversi studi hanno riportato una risposta emodinamica (HR) invertita [15] (vedi Figura 2) o un mix tra le due [16]; questo indica che la vascolarizzazione e l'attivazione cerebrale potrebbero non essere completamente sviluppate. Nonostante questa problematica i cambiamenti emodinamici permangono e rimangono temporalmente correlati ad un'attivazione cerebrale indagabile [14].

I primi studi ad impiegare la fNIRS su neonati utilizzavano un unico canale in grado di fornire misurazioni dell'emodinamica corticale in una specifica area di interesse [16]–[18], mentre attualmente sono in uso sistemi di acquisizione a onda continua multicanale DOT in grado di coprire un'area corticale più estesa con una frequenza di campionamento tra i 5 e i 100 Hz che permette una risoluzione temporale migliorata e una stima delle variazioni emodinamiche più precisa [19].

Nel 1998 le prime immagini ricostruite, raffiguranti cambiamenti emodinamici cerebrali riguardavano la corteccia sensorimotoria in un neonato prematuro con l'impiego di un sistema di monitoraggio composto da 9 sorgenti e 4 rilevatori [20], mentre nel 2001 sono state ricostruite immagini di attivazione per indagare i movimenti del braccio sulla corteccia motoria impiegando 144 canali indipendenti [15].

Anche in anni più recenti sistemi di acquisizione DOT ad alta densità sono stati utilizzati per studiare l'attivazione della corteccia visiva primaria, in neonati sani, sfruttando canali a diverse distanze per diminuire l'impatto delle variazioni dei livelli d'ossigeno derivanti dai tessuti extra cerebrali, aumentando il rapporto segnale-rumore nei dati raccolti [21].

L'attività cerebrale a riposo, registrata in assenza di stimoli esterni o azioni, può fornire informazioni utili ad indagare lo sviluppo cerebrale nel neonato ed è in grado di analizzare la connettività funzionale in stato di riposo. Le prime immagini della connettività riferita alla corteccia visiva sono state derivate da una registrazione di 20 minuti [22]. Nello specifico, la connettività funzionale è stata rilevata unilateralmente, in un neonato pretermine con infarto occipitale sinistro, dimostrando la sensibilità della tomografia ottica diffusa riguardo alla patologia cerebrale in essere. Il tempo di acquisizione, generalmente, non è prolungato al fine di evitare lesioni cutanee o interferenze con altre apparecchiature; per bypassare questa limitazione è stata realizzata una cuffia, principalmente per neonati prematuri, che garantisce una copertura totale per la DOT e il posizionamento di 10 elettrodi per l'EEG per il monitoraggio continuo dell'attività cerebrale. Tale dispositivo, ha mostrato un rapporto segnale rumore elevato senza significative oscillazioni derivanti da movimento nel tracciato se il neonato era sveglio [23].

Le applicazioni della DOT sono utilizzate anche per studiare le patologie neonatali, in particolare, diverse ricerche studiano l'emodinamica in concomitanza a lesioni cerebrali, come nel caso di encefalopatia ipossico-ischemica perinatale (la quale rappresenta una delle principali cause di mortalità neonatale e di sviluppo di deficit neurologici) o di convulsioni; tuttavia, tali applicazioni vanno oltre lo scopo di questa tesi [24], [25].

1.2.1 Problematiche associate all'utilizzo nei neonati pretermine

Esistono delle limitazioni associate all'utilizzo di DOT in ambito neonatale come, ad esempio, le dimensioni fisiche degli optodi che vincolano il numero massimo che può essere utilizzato per una acquisizione multicanale, specialmente nel caso di neonati pretermine, nei quali il peso e le dimensioni sono ulteriormente ridotte. Tuttavia, i dispositivi, con il progresso tecnologico, stanno diventando wireless e miniaturizzati e per tanto tale problema sarà bypassato col tempo. La luce utilizzata per l'acquisizione non penetra a sufficienza nel tessuto cerebrale impedendo di acquisire informazioni riguardanti la materia grigia profonda, i gangli basali e il tronco

cerebrale, implicando l'impossibilità di questo metodo di acquisizione di registrare e valutare l'attività cerebrale completa [26]. Inoltre, non è possibile stimare i valori delle concentrazioni dei cromofori in valore assoluto, ma solo come variazioni di concentrazione e perciò, la mancanza di una quantificazione rende l'analisi semiquantitativa [27] [28].

Il movimento dei neonati durante le acquisizioni porta a degli spostamenti relativi tra gli optodi e lo scalpo e ciò genera delle oscillazioni in ampiezza dell'intensità ottica, che diminuiranno al termine del movimento. Non essendo prolungati nel tempo potrebbe essere possibile estrarre dei periodi con una acquisizione di dati di buona qualità; se questo non dovesse essere possibile sarebbe necessario intervenire correggendo tali anomalie nel segnale, cercando di mantenere il contenuto informativo in esso presente. I metodi che vengono applicati per la correzione degli artefatti da movimento continuano a progredire e a migliorare, costantemente, il risultato ottenibile.

Un'ulteriore limitazione è costituita dalla contaminazione delle acquisizioni NIRS e DOT da parte di un contributo che non dipende dalla attività neuronale, ma derivante da una componente sistemica extra-cerebrale e cerebrale, evocata (assente nel resting state) e non evocata: frequenza cardiaca, respiro e onde vasomotorie sono segnali fisiologici che vengono misurati con questa tecnica e che comportano il rischio di confondere la risposta fisiologica con quella cerebrale. Per la rimozione della componente fisiologica non evocata viene utilizzato un filtro passa-banda. L'utilizzo di una acquisizione multicanale DOT sfrutta misurazioni derivate da canali sovrapposti con differenti distanze tra sorgenti e detettori, per ottenere informazioni a profondità diverse, con l'obiettivo di discriminare l'influenza delle variazioni dei livelli di ossigeno derivanti dai tessuti extra-cerebrali (scalpo e cranio) principalmente delle onde vasomotorie (che condividono la stessa frequenza della risposta emodinamica). I canali in grado di acquisire solamente questi contributi vengono denominati canali a separazione breve [29]–[31]. Attualmente non esiste un sistema DOT in applicazioni neonatali in grado di consentire una regressione del contributo del segnale derivante esclusivamente da cuoio capelluto, meningi cerebrali e cranio, poiché necessiterebbe di una separazione tra sorgente e rilevatore attorno ai 2mm, infattibile per l'attuale stato dello sviluppo hardware della strumentazione [32]. Un'acquisizione DOT, per la ricostruzione delle variazioni dei livelli di ossigeno nel sangue a seguito di attivazioni cerebrali, necessita di informazioni sulla struttura e composizione della testa del neonato. Al momento è necessario effettuare una risonanza magnetica strutturale che permetta la segmentazione dei tessuti nel modello di testa estratto dallo specifico paziente [22],

[33], [34] o utilizzare un atlante realizzato appositamente per un neonato di età simile [35]; ciò comporta comunque un'approssimazione della reale stratificazione e disposizione tissutale. Per non intaccare la risoluzione spaziale dell'acquisizione DOT è necessaria una corrispondenza precisa tra il posizionamento degli optodi sullo scalpo e sull'atlante o acquisizione MRI utilizzata e normalmente si sfruttano uno spazio di coordinate comune che influenza il posizionamento degli optodi limitando, a volte, le possibilità di configurazione [36].

1.3 Connettività funzionale in stato di riposo

Le acquisizioni fNIRS in stato di riposo (rs-fNIRS) possono essere impiegate per esplorare l'attività neuronale a basse frequenze, dove la concordanza temporale tra attività neuronali spontanee, che si verifica in regioni anatomicamente distinte, viene comunemente denominata connettività funzionale in stato di riposo (rs-FC) [37]. Per tanto, si ritiene che due regioni cerebrali mostrino una connettività funzionale, nel momento in cui esiste una relazione statistica tra le misure dell'attività corticale registrate contemporaneamente.

Il cervello è associabile a un concetto di rete funzionalmente e strutturalmente interconnessa che elabora continuamente ed efficientemente informazioni; l'esame della connettività funzionale permette di visualizzare e analizzare l'attività del cervello (nel caso del fNIRS prettamente della corteccia cerebrale) fornendo una misura visiva diretta e semplice delle relazioni funzionali.

Lo stato di riposo è una condizione naturale, nella quale non sono presenti stimoli percettivi evidenti, azioni o comportamenti assunti dal soggetto; è uno stato che permette un confronto tra gli studi riflettendo l'attività cerebrale intrinseca e spontanea [38].

La letteratura sostiene che l'utilizzo dei dati rs-fNIRS per estrapolare le rs-FC sia un metodo valido e applicabile a popolazioni sane o patologiche, sfruttando i vantaggi derivanti dall'utilizzo di questa tecnica di imaging, quali ad esempio la ripetibilità e l'affidabilità delle acquisizioni, per indagare l'architettura della rete cerebrale e i cambiamenti dell'attività corticale con lo sviluppo o la patologia [39]–[44].

Gli approcci per lo studio delle rs-FC sono molteplici, tra i quali annoveriamo: l'analisi delle componenti indipendenti, l'analisi di correlazione seed-based, l'analisi topologica basata sulla teoria dei grafi e l'analisi della correlazione dell'intero cervello [38]. Il primo utilizza i dati

acquisiti da tutti i canali per dividere l'attività cerebrale in sistemi funzionali indipendenti, il secondo calcola le relazioni tramite delle correlazioni temporali eseguite tra le regioni "target" (in posizioni anatomiche di interesse) e tutte le regioni cerebrali rimanenti; mentre il terzo descrive i modelli della struttura topologica delle reti neurali cerebrali. L'ultimo approccio (o analisi della correlazione dell'intero cervello) è anche il metodo impiegato in questo studio, volto alla valutazione delle correlazioni temporali tra le serie temporali acquisite da canali distinti, considerando tutte le possibili combinazioni tra i canali registrati. L'impiego di quest'ultimo metodo nel 2010 ha permesso di dimostrare che la connettività funzionale in stato di riposo muta dinamicamente durante lo sviluppo da pochi giorni post-partum all'età di 6 mesi [38], [45].

Lo studio condotto da Zhang et al. [46] ha identificato la frequenza predominante dello stato di riposo, all'interno dell'area sensorimotoria, utilizzando delle nozioni strutturali a priori; è stata individuata una connettività focalizzata alle basse frequenze, comprese tra 0,01 e 0,0732 Hz. Sasai et al. [47] scomponendo l'attività emodinamica registrata da più regioni corticali in diverse bande di frequenza, da 0.009 Hz a 0.1 Hz, ha evidenziato le influenze della frequenza sulle caratteristiche globali della rsFC. Nello specifico gli esiti hanno mostrato una forte correlazione in tutto il range delle frequenze nelle regioni corticali omologhe, verosimilmente dovuto a connessioni neuronali anatomicamente dirette e nell'intervallo di frequenza compreso tra 0.04 e 0.1 Hz nelle regioni frontali e occipitali (temporaneamente coincide con la risposta emodinamica tipica per un singolo evento), che plausibilmente riflette l'attivazione neurale transitoria tra regioni corticali distanti [38] (vedi Figura 6).

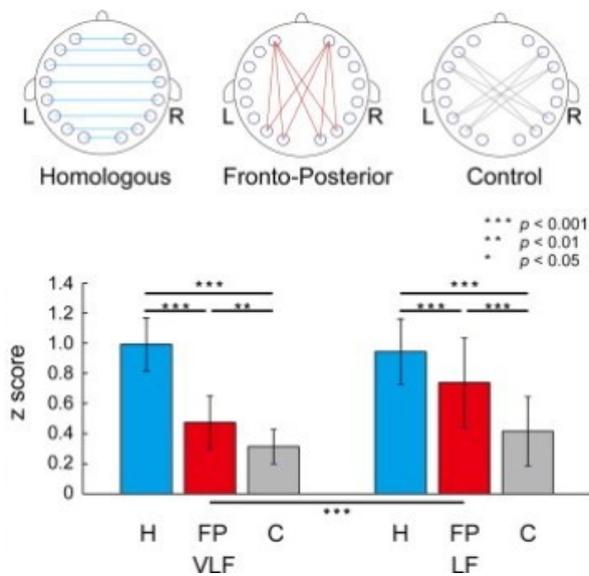


Figura 6: In alto: configurazione delle coppie di connettività selezionate. In basso: Risultato statistico utilizzando il test ANOVA a due vie riferito a frequenze molto basse (0,009–0,02 Hz) nel grafico di sinistra e a frequenze basse (0,06–0,08 Hz) a destra. Vengono riportate le differenze significative tra i gruppi di connettività: H= omologa, FP= fronto-posteriore, C= controllo. Preso da [47].

Attualmente, per studiare l'emodinamica cerebrale in stato di riposo, la maggior parte degli studi ([40], [45], [48]) utilizza un filtro passabanda che va dai 0.009Hz ai 0.08Hz e per analisi della correlazione dell'intero cervello viene spesso impiegata la correlazione di Pearson tra le serie temporali acquisite da ogni coppia di nodi o di regioni di interesse; inoltre, la matrice risultante può essere binarizzata per descrivere l'organizzazione topologica delle reti funzionali. La connettività funzionale non implica una relazione causale o una connessione diretta tra le due regioni, poiché può essere mediata da strutture aggiuntive, come circuiti cortico-sottocorticali, tra i quali annoveriamo i gangli della base e il cervelletto. L'attività può generare forti correlazioni anche se le connessioni strutturali dirette sono deboli o assenti, ma nella maggior parte dei casi questi due aspetti della connettività cerebrale sono convergenti [49].

Inoltre, è necessario rimuovere fattori confondenti, quali artefatti da movimento e rumore strumentale o fisiologico, prima di calcolare la connettività funzionale, per evitare l'eventuale generazione di correlazioni spurie [50], [51].

1.3.1 Applicazioni in abito neonatale

La connettività funzionale rappresenta un potenziale indicatore biologico, a partire dall'ambito neonatale, per monitorare lo sviluppo del cervello ed è stata oggetto di crescente interesse nella comunità di ricerca che utilizza la fNIRS.

Uno dei primi studi in ambito neonatale che si è posto l'obiettivo di cercare una variazione della connettività funzionale con lo sviluppo in un neonato sano a termine (da pochi giorni di vita ai 6 mesi d'età) è quello pubblicato da Homae e colleghi [45]. I risultati mostrano, al progredire dello sviluppo, una connettività aumentata nelle regioni corticali temporali, parietali e occipitali, mentre nelle regioni frontali si riscontra una diminuzione della stessa. Questo pattern descrive la creazione e la recisione di interconnessioni durante lo sviluppo (vedi Figura 7). Nei primi 3 mesi di vita si è verificata una diminuzione del numero di interconnessioni a lunga distanza tra le regioni frontali e posteriori, seguita da un aumento nei 3 mesi successivi, indicando una riorganizzazione della connettività funzionale di queste regioni corticali.

Ferredal et al. [52] hanno utilizzato un'acquisizione DOT ad alta densità, allo stato di riposo, in neonati sani a termine entro i primi 2 giorni di vita, al fine di individuare la connettività funzionale spontanea nei neonati. È emersa una forte correlazione tra le controparti omotope di ciascuna regione di interesse nell'area visiva, medio-temporale e nella corteccia uditiva, indicando che la connettività si presenta già sviluppata nel neonato.

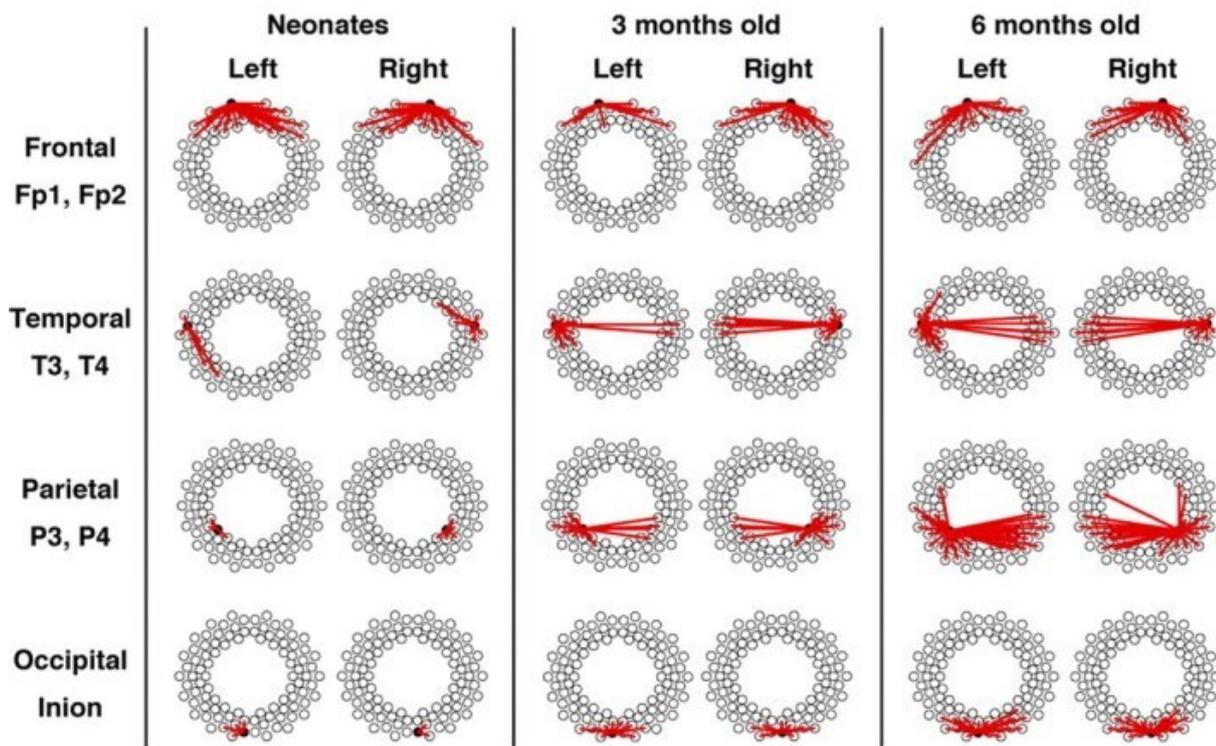


Figura 7: Rappresentazione delle correlazioni superiori ai 0.5 (calcolate come media tra tutti i bambini considerati per le singole età). Preso da [45].

Nel 2012 uno studio [41] ha individuato la connettività funzionale presente nella corteccia visiva di neonati pretermine, senza complicazioni legate al sistema nervoso centrale e ricoverati in terapia intensiva, valutati alla stessa età post-mestruale, dimostrando che questa tecnica ha il potenziale per: diventare uno strumento clinico per la diagnosi precoce di lesioni funzionali, che si possono ripercuotere in un deficit in questo dominio, e essere applicata al capezzale all'interno dell'ambiente clinico. Nel 2013 uno studio [53] ha evidenziato che i neonati prematuri, valutati all'età equivalente a termine, possiedono una connettività superiore tra le regioni bilaterali temporali e le regioni bilaterali parietali, rispetto ai neonati a termine, a differenza della connettività tra le regioni temporale sinistra e parietale sinistra che è risultata inferiore. Il risultato, riportato in Figura 8, indica uno sviluppo sufficiente nelle regioni omologhe della corteccia temporale legata al linguaggio, suggerendo che un'esposizione all'ambiente esterno precoce possa intaccare lo sviluppo di questi tratti accelerandoli, ma ancora associato a un'immaturità della connettività tra la corteccia cerebrale e le regioni occipitali [54].

Questa traiettoria di sviluppo atipica è stata individuata anche nelle aree frontali di neonati pretermine, poiché sono fortemente interessate da uno sviluppo della connettività correlato con l'età, a differenza dei neonati a termine, nei quali i cambiamenti sono maggiormente presenti tra la regione occipitale e temporale sinistra [53] (vedi Figura 9).

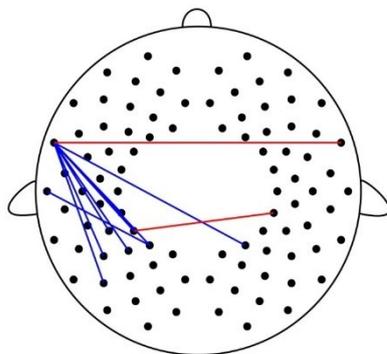


Figura 8: Differenze significative nella connettività funzionale tra neonati pretermine (linee rosse) e neonati a termine (linee blu). Preso da [53].

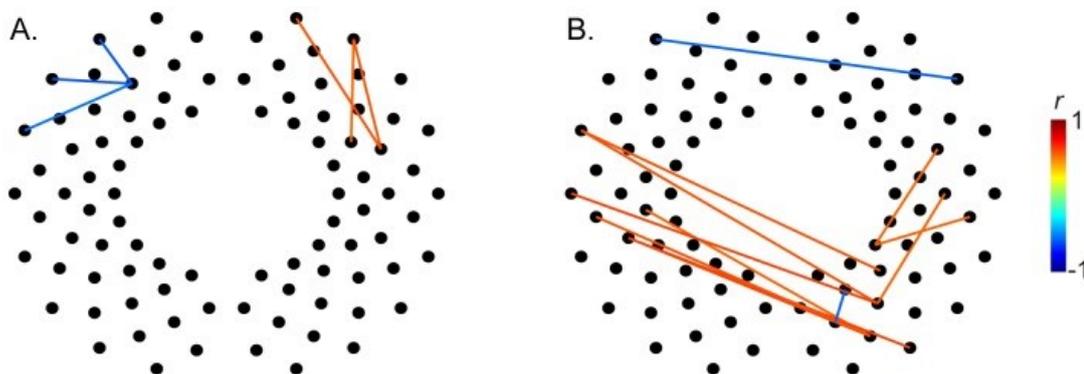


Figura 9: Cambiamenti nello sviluppo delle connessioni funzionali. A) neonati pretermine, B) neonati a termine. Le linee cambiano colore a seconda dei coefficienti di correlazione r , come riportato nella barra colore a destra. Preso da [53].

In uno degli studi più recenti, datato 2022 [55], si ricercava una differenza nella connettività intercerebrale, tra neonati pretermine e a termine, che dipendesse dall'età. I pazienti sono stati suddivisi sulla base dell'età gestazionale alla nascita in 3 gruppi (neonati pretermaturi con età

gestazionale inferiore alle 30 settimane, neonati pretermine con età gestazionale superiore alle 30 settimane e neonati a termine) e le reti dello stato di riposo (RSN) cerebrali sono state individuate tramite acquisizioni fNIRS nelle regioni temporali, frontali e parietali, eseguite in una stanza buia e silenziosa mentre i neonati dormivano.

I neonati pretermine con un'età gestazionale superiore alle 30 settimane hanno evidenziato una RSN più forte rispetto ai neonati con età gestazionali inferiori, ma anche rispetto ai neonati a termine. L'analisi di regressione degli RSN in relazione all'età postnatale ha mostrato un andamento più pronunciato nei neonati prematuri (≥ 30 settimane gestazionali) e a termine rispetto a quelli con un'età gestazionale inferiore, in particolare per quanto riguarda la connettività funzionale tra la corteccia frontale e temporale sinistra. Questo suggerisce che un adeguato sviluppo cerebrale nell'ambiente uterino avviene prima del raggiungimento delle 30 settimane di gestazione, spiegando una maggior frequenza di compromissioni nello sviluppo neurologico nei neonati estremamente prematuri piuttosto che in quelli moderatamente pretermine, come già individuato in precedenza da Hand et al. [56].

CAPITOLO 2: PREMATURITÀ ED ESITI DELLO SVILUPPO NEUROPSICOLOGICO NEI PRIMI ANNI DI VITA

2.1 Sviluppo neuropsicologico nei bambini nati pretermine

Lo sviluppo neuropsicologico, ovvero la crescita e il cambiamento delle funzioni cognitive e comportamentali del cervello umano lungo tutto l'arco della vita, comprende l'acquisizione e il miglioramento delle abilità cognitive, tra le quali annoveriamo la memoria, l'attenzione e il dominio motorio. La neuropsicologia è la branca della psicologia che lo studia ed in particolare indaga su come determinati fattori, in questo specifico caso la nascita prematura, possono influire sulla maturazione e il funzionamento delle abilità cognitive e comportamentali.

Un neonato viene definito prematuro se nato prima delle 37 settimane di gestazione, ma è possibile approfondire ulteriormente questa classificazione andando ad individuare quattro sotto intervalli, relativi sempre al periodo di gestazione, come segue:

- Estremamente pretermine (EP - Extremely Preterm), nati prima delle 28 settimane;
- Molto pretermine (VP - Very Preterm), nell'intervallo tra le 28 e le 31 settimane;
- Moderatamente pretermine, compresi tra 32 e 33 settimane
- Pretermine tardivo, tra le 34-36 settimane.

Un'ulteriore differenziazione è effettuabile in base al peso alla nascita, poiché è una caratteristica che impatta sullo sviluppo neuropsicologico, in particolare è possibile distinguere in neonati con un peso alla nascita:

- molto basso (VLBW - Very Low Birth Weight <1500g)
- estremamente basso (ELBW - Extremely Low Birth Weight <1000g).

Queste categorizzazioni vengono riportate per comprendere appieno la coorte di bambini compresi in questo studio e in quelli che verranno citati.

Ogni anno circa 15 milioni di neonati nascono prematuramente e tra questi il 5% prima delle 28 settimane di gestazione presentando, generalmente, un peso alla nascita molto basso. Con l'aumento della sopravvivenza di questi neonati negli ultimi decenni, dovuto ad un miglioramento delle cure e tecnologie utilizzate, differenti studi individuano un incremento dello sviluppo di deficit cognitivi e motori proprio in questa popolazione, identificandoli addirittura nel 50% dei casi [57] [58]. In riferimento a disabilità gravi, invece, queste sono

presenti nella popolazione prematura nel 15-20% dei casi in neonati ELBW e in meno nel 10% nei neonati VLBW e per avere una chiara idea dell'importanza di tali numeri si pensi che nel caso di bambini a termine si parla solamente di un 0.5% [59].

Una metanalisi del 2008 riporta che, tra i bambini sopravvissuti a età gestazionali alla nascita molto basse, il 42,2% dei neonati nati durante la 24esima settimana presentava disabilità da gravi a moderate, mentre nel caso di nascite nella 25esima settimana la percentuale si attesta al 32,6%; invece, nei nati a 26 settimane, si hanno disabilità da gravi a moderate nel 20,2% dei casi, indicando una tendenza in decrescita all'aumentare del numero delle settimane di gestazione alla nascita (vedi la Figura 10) [60], [61].

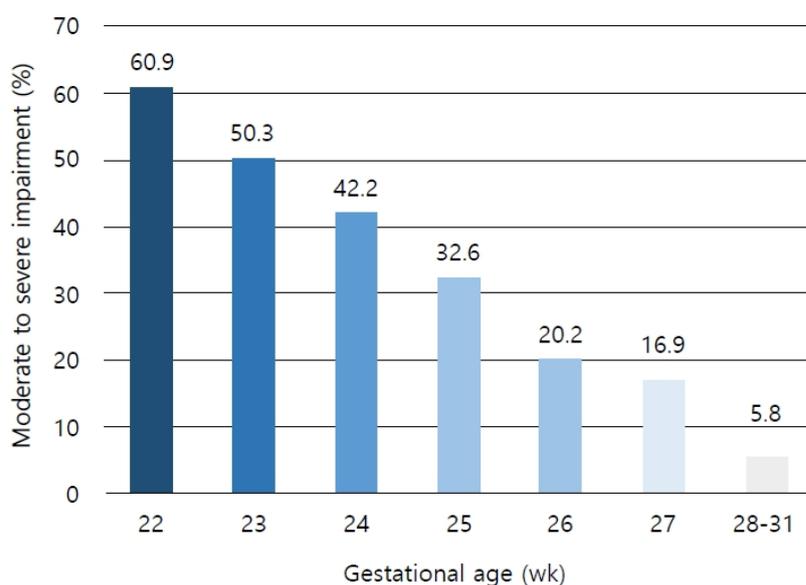


Figura 10: Probabilità di presentare deficit al variare dell'età gestazionale alla nascita in neonati pretermine. Preso da [61].

I disturbi cognitivi, conseguenti alla nascita prematura, sembrano essere meglio descritti tramite il concetto di maturazione cerebrale atipica piuttosto che di un ritardo maturazionale. Nel primo caso si parla di una mancanza nel raggiungimento, in tarda infanzia, del livello normale di maturazione riguardo una determinata funzione cognitiva, perché caratterizzata da una progressione alterata con traiettoria atipica; mentre, nel secondo caso le traiettorie dello sviluppo non si scostano da quelle tipiche, ma sono caratterizzate da una lenta progressione nel

raggiungimento di una specifica funzione, sia essa psichica o fisica, che, tuttavia, vacilla nel raggiungimento del normale livello di sviluppo [62].

Lo sviluppo cognitivo non dipende esclusivamente dalla condizione alla nascita e dalla genetica, in quanto è stato reso noto che un contributo fondamentale deriva anche da fattori ambientali, soprattutto nelle prime fasi della vita [62], [63]. L'alterata traiettoria evolutiva potrebbe essere ridirezionata, almeno in parte, da fattori di compensazione cognitiva, affettiva e sociale, anche se non si sa bene entro quali limiti essi operino, poiché l'esposizione a un ambiente ricco di stimoli agisce su un substrato neurale non completamente formato, e l'effetto di questa esposizione non è ancora chiaro [62]. Una corrente di pensiero sostiene che un ambiente ricco di suoni, voci e stimoli visivi possa agire positivamente inducendo la neoformazione di sinapsi tra i neuroni del sistema nervoso centrale, nota come sinaptogenesi, e pertanto portare ad una maturazione corticale; contrariamente una seconda linea di pensiero evidenzia invece come l'esposizione prematura all'ambiente extrauterino risulti deleteria in quanto gli stimoli, seppur filtrati, agiscono su un substrato corticale troppo immaturo [64].

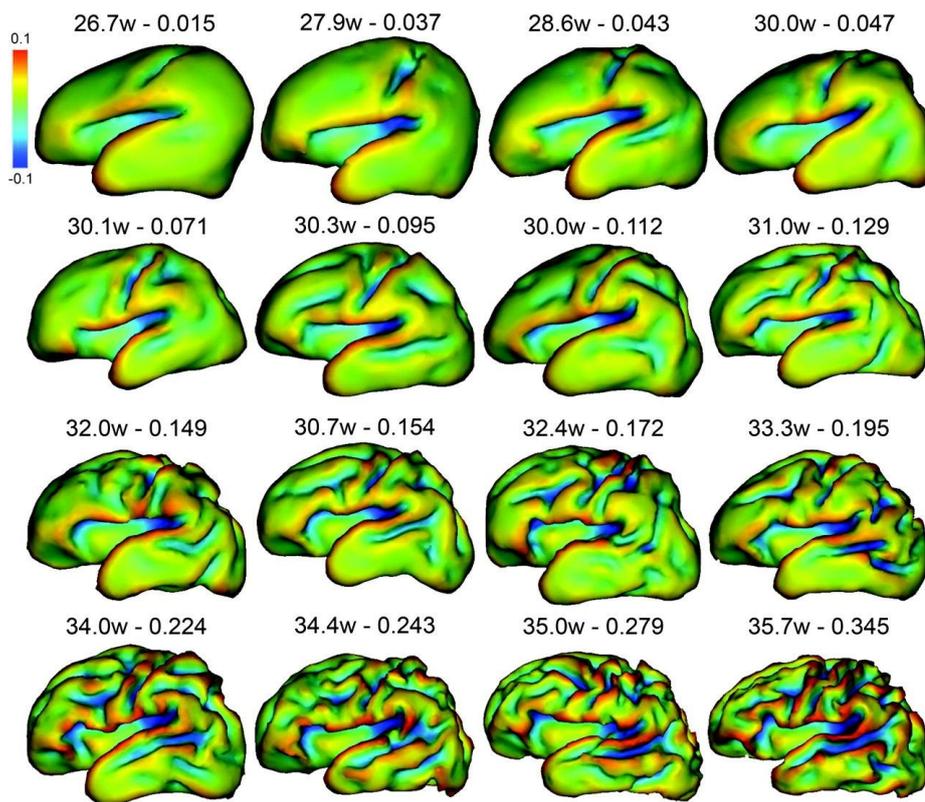


Figura 11: In questa figura sono illustrate le superfici corticali in neonati prematuri a diverse età gestazionali,

accompagnate dagli indici di sviluppo corrispondenti. La variazione dei colori sulla superficie rappresenta la profondità delle curvature e dei solchi. Le immagini non sono riferite alla stessa scala spaziale. Preso da [65].

Localizzare le funzioni neurocomportamentali nella corteccia del feto durante lo sviluppo è molto complesso poiché è nell'intervallo tra le 24 e le 32 settimane di gestazione che le sinapsi diventano evidenti a livello della placca corticale profonda e che i circuiti permanenti associati ai sensi iniziano ad evolversi in specifiche aree. Il volume cerebrale aumenta, quadruplicandosi, tra le 28 e le 40 settimane post-concezionali (ciò è stato confermato tramite risonanze magnetiche) con conseguente incremento dello spessore degli strati corticali superiori.

L'interruzione precoce dello sviluppo cerebrale in utero e la mancanza di una corretta girificazione nei neonati prematuri (vedi Figura 11), che sono suscettibili all'influenza di fattori ambientali molto prima del dovuto, potrebbero portare a deficit funzionali che costituiscono la base per lo sviluppo di patologie neurocomportamentali. Questi deficit funzionali potrebbero essere identificati tramite l'analisi dei parametri che caratterizzano la struttura e l'attività cerebrale alla nascita [66].

La letteratura ha evidenziato che i bambini prematuri, se messi a confronto con bambini a termine, presentano dei punteggi di quoziente intellettivo (QI) mediamente più bassi di circa 10 punti, in riferimento ad un'intelligenza più generica, ma in particolare presentano delle lacune associabili a deficit legati all'attenzione, alla memoria, al linguaggio e alla comunicazione perciò riferiti a specifici domini neuropsicologici [67], [68]. Sebbene alcuni di questi i punteggi rientrino nei range di normalità sono comunque inferiori rispetto ai nati a termine [69], [70].

Dopo aver fornito un'analisi generale degli effetti della nascita pretermine, dei fattori che influenzano maggiormente lo sviluppo e le percentuali dei neonati affetti da deficit cognitivi (e non) riconducibili alla prematurità, è opportuno concentrarsi su determinati domini per capire gli esiti a breve e lungo termine. È importante tenere a mente che gli studi sono difficilmente confrontabili a causa della moltitudine dei metodi impiegati nella valutazione: dall'area geografica, al reclutamento mono o multicentrico, dai criteri utilizzati per il reclutamento alle età differenti ai follow up; pertanto, i risultati e le evidenze sono riportate a scopo conoscitivo e non comparativo. Nello specifico verranno rese note alcune informazioni riguardanti ELBW e VLWB in bambini/neonati EP o VP fino ai due anni di vita, senza danni a carico del sistema

nervoso centrale alla nascita. Questo per avere un'idea dello sviluppo e le problematiche ad esso associate, nella coorte di bambini che vengono trattati in questo studio.

Le abilità motorie sono fortemente intaccate dalla nascita prematura a partire dall'interruzione della normale maturazione cerebrale, come già affermato e da fattori ambientali, quali i vincoli posturali in terapia intensiva neonatale. Alcuni studi riportano che, al diminuire dell'età gestazionale e del peso corporeo, gli esiti dello sviluppo motorio peggiorano, specialmente nei primi anni di vita ed al contempo, a partire dall'età prescolare, emergono evidenze riguardanti difficoltà nel possedere abilità motorie più avanzate come l'equilibrio e la destrezza manuale, mettendo in difficoltà il cervello ed il corpo del bambino [71]. In particolare, Sansavini et al. [72] in uno studio su neonati prematuri senza danni a carico del sistema nervoso, dimostrava che negli EP venivano ottenuti punteggi più bassi e traiettorie atipiche sia nello sviluppo del grosso motorio che del fine motorio rispetto ai VP, con differenze più evidenti a partire dai 6/24 mesi. In generale è possibile affermare che il ritardo motorio è presente nel 12% dei prematuri nati tra le 26 e le 27 settimane di età gestazionale e nel 5.8% dei nati tra le 28 e le 32 [61].

Nel 2018 una metanalisi ha determinato che circa uno su sei tra VPT o VLBW all'età corretta di due anni presentava dei ritardi motori, uno su cinque cognitivi e uno su quindici sviluppava paralisi cerebrale, sottolineando che alla diminuzione del peso e dell'età gestazionale alla nascita queste probabilità aumentavano [73].

Per quanto concerne lo sviluppo del linguaggio, in un ampio campione di neonati molto prematuri senza danni cerebrali gravi a carico del sistema nervoso, si osservano dei deficit nel 30% dei casi che, in più della metà, sono associabili anche a ritardi cognitivi o evolutivi; tuttavia, altri studi hanno riscontrato ritardi linguistici anche in assenza di compromissioni a livello cognitivo [71], [74]. Nello specifico queste mancanze sono presenti maggiormente in bambini molto o estremamente prematuri sottoforma di lacune grammaticali e lessicali, oltre che nella comprensione, riscontrabili a partire dai 2/3 anni d'età [2]. Nei bambini nati a termine l'incidenza di ritardi nel linguaggio tende a diminuire attorno a questa età, quando nei bambini pretermine nati tra le 28 e 32 settimane gestazionali, si presenta invece un aumento [71].

Nel caso di bambini prematuri a 2 anni, che apprendono più di una lingua nativa, vengono riportati ritardi nel lessico espressivo e nella grammatica, con un aumento della numerosità nel caso di nati estremamente prematuri [75], [71], [74].

La memoria visiva e l'attenzione sono i precursori di quelle che vengono definite le "funzioni esecutive", le quali, a 1-2 anni non sono ancora sviluppate e per tanto, non possono essere

testate. Con funzioni esecutive si intendono un insieme di capacità cognitive fondamentali che consentono la pianificazione, l'inibizione, la flessibilità cognitiva, il controllo emotivo, la risoluzione dei problemi, l'autoconsapevolezza e comprendono la memoria di lavoro e l'attenzione selettiva.

Il funzionamento esecutivo in bambini pretermine, soprattutto a età gestazionali inferiori, pare essere correlato a volumi inferiori nei gangli cerebrali e cerebellari ed a interruzioni della sostanza bianca sottocorticale nelle reti tra la regione frontale, striatale e talamica [76], [77]. Queste caratteristiche incidono sulla connettività funzionale e nello specifico sul rallentamento della velocità di elaborazione delle informazioni. Le funzioni esecutive sono essenziali per affrontare attività complesse nella vita quotidiana, dal lavoro all'istruzione e normalmente vengono testate a partire dalla fine dell'età prescolare (4-5 anni) dove, spesso, vengono individuate come deficitarie nei prematuri. Perciò, in questo studio, con lo scopo di individuare precocemente e con maggiore probabilità l'insorgenza di tali carenze, vengono testate specificatamente la memoria visiva e l'attenzione visiva in bambini pretermine, come precursori delle più evolute funzioni cognitive.

2.2 L'attenzione e il suo sviluppo nei bambini prematuri

L'attenzione costituisce un processo cognitivo, formato da più componenti, di fondamentale importanza, basato su un complesso meccanismo multidimensionale di selezione e filtraggio di una molteplicità di stimoli provenienti dall'ambiente circostante [148]. Negli anni è stata studiata da diverse prospettive al fine di esplorare in modo completo tutti gli aspetti che contribuiscono sinergicamente a questo processo e in tale contesto, essa si manifesta attraverso l'allocazione di risorse mentali, cognitive ed emotive verso un aspetto specifico e rilevante della realtà, comportando, contestualmente, l'omissione di altri oggetti, siano essi di natura fisica o concettuale. Questo processo selettivo risulta cruciale per la capacità di focalizzazione e orientamento, poiché consente di mitigare le possibili fonti di distrazione o interferenza che potrebbero minare l'efficacia della concentrazione [78]. Trascurare alcuni aspetti della realtà è utile ad evitare un sovraccarico delle informazioni, in quanto, disponendo di risorse limitate come riportano studi elettrofisiologici, di neuroimmagine e comportamentali, permette di orientare volontariamente l'attenzione verso lo stimolo e di identificarlo, registrandolo

consapevolmente. Nello specifico questo processo è stato suddiviso in 3 componenti: il disimpegno, che consiste nella capacità di distogliere l'attenzione da un punto di interesse o area del campo visivo prima di volgere lo sguardo verso un altro stimolo; lo spostamento, ovvero la capacità di spostare l'attenzione verso la posizione in cui si trova il nuovo stimolo; e l'ancoraggio, cioè la fissazione dell'attenzione verso lo stimolo. Sullo studio di queste componenti attentive si basa il paradigma Gap-Overlap presente nello studio che va a studiare l'attenzione del bambino focalizzandosi sul disimpegno e lo spostamento. La fase di orientamento o spostamento è distinguibile dai movimenti oculari del bambino, valutando se lo sguardo va nella direzione dello stimolo target. Analogamente la fase di disancoraggio può essere valutata come il tempo richiesto al bambino per iniziare lo spostamento dello sguardo da uno stimolo precedentemente fissato ad uno stimolo nuovo che appare nel campo visivo. L'identificazione o ancoraggio è calcolabile come la durata media del tempo di fissazione sullo stimolo.

Da evidenze estratte da studi che hanno utilizzato la fMRI e la PET è stato possibile individuare tre meccanismi, in grado di agire coordinatamente con i sistemi di elaborazione sensorimotoria, che descrivono i processi attentivi: l'attenzione vigile o d'allerta, l'attenzione selettiva (o d'orientamento) e l'attenzione esecutiva. La prima è associata alla capacità di regolare e mantenere uno stato di attivazione elevato in risposta alle sollecitazioni che provengono dall'ambiente, con notevole dispendio d'energia; la seconda permette di orientare selettivamente l'attenzione su stimoli rilevati nell'ambiente esterno o interno; la terza spiega l'abilità nel gestire informazioni in conflitto per perseguire un obiettivo, inibendo e coordinando le azioni da eseguire [79] [6]. Per poter distinguere la tipologia di attenzione di un ipotetico soggetto a seconda delle aree attivate è possibile associare a questi meccanismi delle differenti allocazioni a livello cerebrale, come riportato in Figura 12, sebbene certi studi suggeriscano, comunque, una certa possibilità di interazione tra le diverse aree [7]. L'attenzione selettiva è quella di interesse per questa tesi, nonostante anche l'attenzione vigile lo sia, in quanto indica la capacità del bambino di eseguire dei compiti di una certa durata.

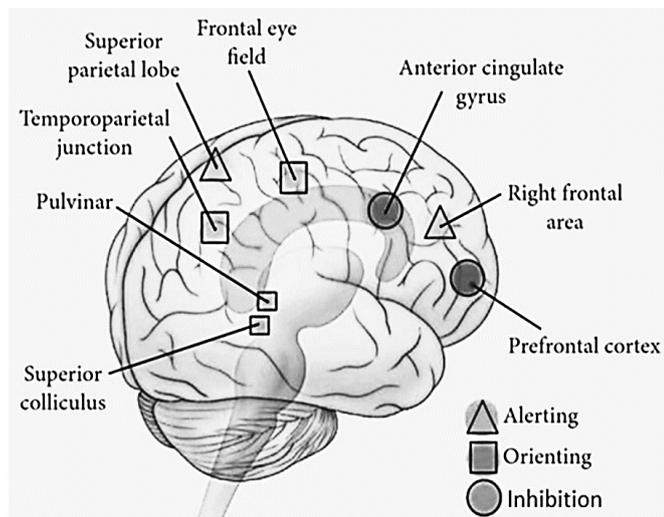


Figura 12: Distinzione a livello cerebrale delle tre reti attenzionali: allerta, orientamento e attenzione esecutiva. Preso da [6].

Per i fini dello studio è importante sapere che precedenti ricerche hanno dimostrato che l'attenzione selettiva o di orientamento nei bambini con capacità attentive meno sviluppate, si presenta con durate dello sguardo più lunghe e uno spostamento dell'attenzione più lento [80]. In genere lo sviluppo iniziale dell'attenzione nel prematuro non è pari a quello dei bambini nati a termine e le differenze tendono ad essere maggiori all'aumentare dell'età [81].

Il sistema d'orientamento attentivo diviene completamente funzionale entro i primi 6 mesi di vita ed è stato valutato con molteplici paradigmi quali: l'abituazione visiva, che consiste nel far accostumare il bambino a uno stesso stimolo finché non mostra una diminuzione della risposta ad esso, oppure la preferenza visiva, dove vengono mostrati al bambino due stimoli allo stesso momento andando a valutare quale stimolo guarda per primo e per quanto tempo [82], [83]. Gli indici attentivi vengono calcolati usando la durata delle fissazioni e la velocità di spostamento dell'attenzione nel caso di coppie di stimoli, considerando che tempi di fissazione più lunghi e movimenti oculari più lenti riflettono un disimpegno e uno spostamento dell'attenzione meno efficienti [83], [84].

Durante le prime fasi dello sviluppo le difficoltà associate all'attenzione sostenuta in bambini prematuri non sono sempre evidenti, ma lo diventano con l'età. Infatti, diversi studi eseguiti entro l'anno di vita presentano risultati discordanti, mentre nella letteratura riferita all'età prescolare gli esiti concordano nell'affermare che i nati pretermine manifestano tempi più brevi

di attenzione sostenuta rispetto a quelli a termine e mostrano difficoltà nell'inibizione di aspetti di distrazione o irrilevanti del compito [85], [86].

2.3 La memoria di riconoscimento visivo e il suo sviluppo nei bambini nati pretermine

La memoria è una funzione cognitiva costituita da più componenti, che consente di immagazzinare esperienze e riprodurre nella mente la conoscenza passata sotto forma di immagini, sensazioni o informazioni e di identificarla come tale; su essa si fondano differenti processi cognitivi come il pensiero e il linguaggio [148]. La memoria si differenzia per la sua durata (se breve o a lungo termine) e per la sua capacità (se limitata o illimitata) e può essere divisa in 3 principali tipi di memoria visiva in base a queste caratteristiche: memoria iconica, memoria di lavoro (o a breve termine) e memoria a lungo termine.

Nel 1960 George Sperling ha dimostrato l'esistenza della memoria iconica, ossia una tipologia di memoria visiva in cui uno stimolo nel momento in cui svanisce a livello percettivo è in grado di permanere nella mente per un breve periodo (circa 200 ms). La memoria iconica ha durata brevissima, ma capacità illimitata.

Solamente nel 1968 è stato introdotto da Baddeley ed Hitch il concetto di "memoria di lavoro", che ha durata molto breve e capacità limitata. Essa è composta da un sistema di elaborazione, di capacità limitate, il cui ruolo consiste nel processare stimoli sensoriali e le richieste cognitive che il sistema deve elaborare, un loop articolatorio, che permette di mantenere/ripetere le informazioni nella mente attraverso un codice fonologico basato sul suono e una componente definita taccuino visuo-spaziale, specializzata nella codifica, memorizzazione ed elaborazione di stimoli esclusivamente visivi. Le informazioni sensoriali dopo essere state decodificate possono poi essere trasferite alla memoria a lungo termine che è in grado di conservarle per tempi maggiori.

La memoria di interesse per questa tesi è quella visiva a breve termine, che nello specifico permette di memorizzare esclusivamente informazioni di carattere visivo e nei bambini può essere valutata decodificando i loro movimenti oculari e le loro fissazioni. La disamina della memoria visiva viene ottenuta utilizzando dei paradigmi che valutano la risposta del bambino a elementi di novità; queste misure mnemoniche sembrano essere correlate a misure

dell'intelligenza della persona in quanto riconducibili all'interesse o alla curiosità per situazioni/stimoli nuovi e all'abilità di estrarre informazioni non note da essi [87]. Il quoziente intellettivo sembra essere strettamente correlato al corretto funzionamento della memoria visiva che, sebbene in forma rudimentale, si presenta nel bambino a partire dai 2 mesi, quando acquisisce l'abilità di preferire uno stimolo variabile rispetto ad uno fisso, in quanto è stato familiarizzato all'informazione fissa rispetto all'elemento di novità [87]–[90]. Questa tipologia di memoria aumenta la sua efficacia all'aumentare dell'età, poiché si osservano tempi di familiarizzazione inferiori e per essere stimolata efficacemente è necessario presentare al bambino test con complessità maggiori, dato che si nota un cambiamento nella loro preferenza visiva [91], [92].

In uno studio del 1983 [93] la memoria di riconoscimento visivo è stata valutata in bambini pretermine di 6/12 mesi e messa a confronto con dei controlli nati a termine utilizzando due stimoli: uno fisso e uno variabile. È emerso che il tempo necessario affinché il bambino familiarizzi con lo stimolo fisso diminuisce all'aumentare dei mesi, ma le performance nei bambini pretermine, sebbene migliorino con l'età, sono inferiori rispetto ai controlli. Questo ritardo risulta essere correlato anche a: durate dello sguardo più lunghe, velocità di spostamento degli occhi verso lo stimolo più lente e tempi maggiori nel processare informazioni nuove in bambini di 5, 7, e 12 mesi di vita, peculiarità che possono essere sfruttate per valutare l'efficacia della memoria di riconoscimento visivo [94][95].

2.4 Valutazione dello sviluppo di bambini e neonati tramite l'impiego delle Scale Bayley III

Le scale Bayley III [96] sono un “test di sviluppo”, uno strumento clinico che permette di valutare le capacità cognitive, linguistiche, motorie, socio emotive e comportamentali del bambino, fornendo un'analisi del suo livello di maturazione, consentendo di identificare anticipatamente la presenza di un eventuale ritardo nello sviluppo [97], [98]. Questa valutazione viene effettuata tramite un'osservazione diretta da parte di esperti con l'aiuto del caregiver e può essere effettuata dai 16 giorni ai 41 mesi d'età, ma il suo scopo non è la determinazione del QI, bensì la verifica del raggiungimento delle tappe significative della crescita.

Le scale Bayley III sono costituite da 5 scale, di cui 3 a somministrazione diretta mentre le restanti due dispensate ai genitori; tra queste, le scale di interesse per questo studio, sono le scale: cognitiva, linguistica, motoria e socio emozionale. Queste vengono eseguite seguendo delle indicazioni precise per l'ordine di somministrazione degli item, in modo tale garantire una valutazione il più standardizzata possibile, mentre la tipologia di relazione che si instaura con il bambino è più flessibile e si basa sulla valutazione che esegue il clinico dei tratti di quest'ultimo [149].

La scala cognitiva presenta 91 item in ordine di difficoltà crescente che vengono valutati cercando di minimizzare l'impatto del linguaggio e delle abilità motorie sulle richieste che vengono fornite dall'esperto al bambino. I compiti richiesti al bambino sotto forma di gioco vogliono valutare lo sviluppo sensorimotorio, la formazione e la memorizzazione di concetti, l'esplorazione e manipolazione di oggetti. La sua complessità aumenta in modo crescente all'incirca fino ai due anni d'età.

La scala motoria valuta la motricità del bambino tramite due sottoscale riferite al fine e grosso motorio: la scala fine-motoria si compone di 66 item che valutano movimenti muscolari più piccoli e precisi, nello specifico di mani e dita, mentre, la scala grosso-motoria, formata da 72 item, esamina movimenti più ampi che coinvolgono muscoli e articolazioni di arti e tronco.

La scala del linguaggio è anch'essa composta da due sottoscale, una riferita alla comunicazione recettiva e l'altra alla comunicazione espressiva. La prima è composta da 49 item e valuta aspetti come il comportamento preverbale, la comprensione verbale e lo sviluppo del vocabolario morfologico, la seconda scala è complementare alla precedente dato che analizza aspetti come la comunicazione preverbale, lo sviluppo morfosintattico e del vocabolario.

L'ultima scala di interesse è quella socio-emozionale, formata da 35 item (Figura 13). Viene somministrata al caregiver tramite un questionario che valuta le abilità emotive e sociali del bambino, ovvero come gestisce le emozioni, comunica con gli altri o, in generale, i propri bisogni [99], [149].

Queste scale sono state standardizzate su un campione di 1700 bambini (nati tra i 16 giorni e i 43 mesi e 15 giorni) basandosi sulle ricerche più recenti relative allo sviluppo e sono in grado di permettere il confronto tra bambini, anche se nati prematuramente [99]. Un bambino rientra nel range di normalità se i punteggi compositi calcolati per ogni singola scala rientrano nel range 100 +/- 15.

Sono stati condotti diversi studi per verificare la validità di questo strumento nel discriminare tra neonati prematuri e non; ad esempio uno studio del 1985 ha riportato per entrambi i gruppi punteggi nel range di normalità, ma nel caso dei prematuri questi erano inferiori in modo statisticamente significativo nella scala motoria e cognitiva [100].

Nel 2015 [101] l'utilizzo di questa scala è stato validato per l'identificazione precoce di ritardi specifici nello sviluppo in funzione dei punteggi nelle singole scale, sebbene la valutazione sia legata a una sottostima di tali ritardi sia nel caso di bambini nati prematuri che bambini nati a termine [102], [103], [104]. Per questo motivo nel presente studio e in quelli seguenti, le scale Bayley III vengono eseguite insieme ad altri test più specifici, che non eseguono una valutazione di tipo globale e per tanto in grado di avere una maggiore sensibilità predittiva rispetto alle scale Bayley III che possiedono una minor capacità di previsione.



Scala socioemozionale

Questa parte del questionario presenta dei punti di arresto specifici, basati sull'età del/la vostro/a bambino/a. Per ogni domanda cerchiate il numero nella colonna che meglio descrive quanto spesso avete osservato il comportamento del/la vostro/a bambino/a. Cerchiate un solo numero per ogni domanda. Rispondete a tutte le domande finché non arrivate al punto di arresto previsto per l'età del/la bambino/a. Se il/la bambino/a non mostra il comportamento descritto, cerchiate 0 per indicare "Non so".

	Frequenza del comportamento					
	Non so	Mal	Qualche volta	Metà delle volte	Spesso	Sempre
1. Mostra un sereno e gioioso interesse per molti suoni.	0	1	2	3	4	5
2. Potete facilmente attirare la sua attenzione senza insistere troppo.	0	1	2	3	4	5
3. Mostra un sereno e gioioso interesse verso giocchini e stimoli colorati e vivaci.	0	1	2	3	4	5
4. Mostra un sereno e gioioso interesse verso giocchini e stimoli poco colorati e poco vivaci.	0	1	2	3	4	5
5. Gli/le piace toccare o essere toccato/a da cose o oggetti diversi.	0	1	2	3	4	5
6. Potete ottenere facilmente una reazione quando lo/la toccate anche in maniera non energica e decisa.	0	1	2	3	4	5
7. Gli/le piace essere dondolato/a, ballare in braccio a voi o essere sollevato/a con slancio in alto.	0	1	2	3	4	5
8. Potete attirare facilmente la sua attenzione avvicinandovi o muovendovi lentamente intorno a lui/lei.	0	1	2	3	4	5
Per il calcolo del punteggio degli stati emozionali, sommate le domande da 1 a 8.						/40
9. Si lascia consolare e calmare facilmente.	0	1	2	3	4	5
10. Guarda immagini interessanti, come il vostro viso o un giocattolo.	0	1	2	3	4	5
11. Guarda verso, o si gira verso, suoni interessanti.	0	1	2	3	4	5
Fermarsi qui se il bambino ha da 0 a 3 mesi.						Stadio 1

Figura 13: Esempio di questionario somministrato al caregiver per valutare lo sviluppo socio-emotivo. La quantità degli item da valutare varia in funzione dell'età del bambino.

2.5 Relazione tra attività cerebrale e neurosviluppo nei neonati prematuri

I deficit cognitivi, che si presentano durante lo sviluppo nei bambini pretermine, dipendono dalla condizione neurobiologica alla nascita, nonostante non sia ancora chiaro in qual misura e quanto una valutazione dell'attività cerebrale alla nascita possa risultare efficace nella previsione di queste carenze dal momento che, come detto in precedenza, parte del neurosviluppo dipende anche da fattori ambientali legati all'esperienza. Una diagnosi affidabile, associata alla presenza di determinate problematiche nel bambino, avviene attorno ai due anni o in età prescolare, mentre individuare eventuali deficit nel periodo antecedente è molto complesso, in quanto i primi 24 mesi sono teatro di una maturazione cerebrale funzionale e microarchitetturale più rapida che in tutto l'arco della vita [105], [106].

Uno studio del 2018 [106] ha indagato la presenza di un'eventuale correlazione tra la funzionalità e la struttura cerebrale alla nascita e gli esiti del neurosviluppo in 38 neonati pretermine nati prima delle 32 settimane di gestazione (Figura 14). L'attività cerebrale è stata monitorata entro le prime 72h dalla nascita utilizzando l'elettroencefalografia integrata in ampiezza (aEEG), ovvero una tecnica di monitoraggio più semplice rispetto all'elettroencefalografia tradizionale, in grado di misurare l'ampiezza delle onde cerebrali per rilevare anomalie o variazioni nell'attività. All'età equivalente a quella di un neonato a termine, il neonato è stato sottoposto ad un esame strutturale utilizzando la risonanza magnetica, con lo scopo di ottenere delle rappresentazioni anatomiche ad alta risoluzione del cervello. L'esito dello sviluppo è stato valutato a 2 anni d'età corretta utilizzando le scale Bayley II su 27 bambini dei 34 iniziali.

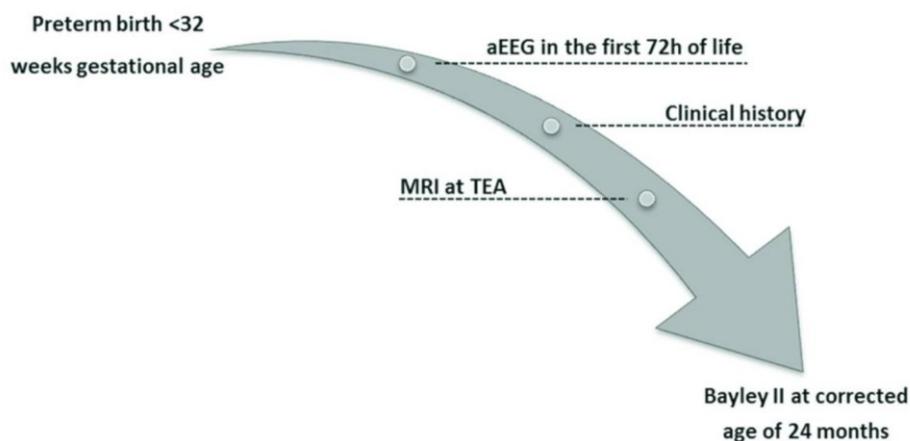


Figura 14: schema delle analisi che vengono effettuate sulla coorte di pazienti, riportate in ordine cronologico. Preso da [106].

Ne è emersa una relazione chiara tra le acquisizioni cerebrali registrate alla nascita, come informazione combinata tratta dall'aEEG e dalla risonanza magnetica e l'alto rischio di compromissione del neurosviluppo, nello specifico:

- il punteggio Burdjalov [107] (sistema in grado di valutare i cambiamenti durante il monitoraggio della funzione cerebrale utilizzando aEEG) del primo giorno di vita è stato individuato come predittore indipendente dell'indice di sviluppo psicomotorio;
- Il diametro interemisferico è stato individuato come predittore indipendente dell'indice di sviluppo psicomotorio e dell'indice di sviluppo mentale.
- La presenza di un'emorragia intraventricolare alla nascita è stata individuata come predittore indipendente dell'indice di sviluppo mentale;

tuttavia, la coorte è poco numerosa per trarre delle conclusioni generalizzabili [106].

Nel 2021 uno studio [105] ha indagato la relazione tra la microarchitettura corticale valutata tramite l'MRI su una coorte di 511 neonati molto prematuri (< 33 settimane gestazionali) e gli esiti del neurosviluppo valutati tra i 4 e i 7 anni, andando a considerare anche gli aspetti derivanti dall'ambiente domestico. La risonanza magnetica veniva eseguita all'età equivalente al termine, tra le 38 e le 44 settimane post mestruali. La valutazione del neurosviluppo è stata eseguita su 251 di questi pazienti tramite dei questionari compilati dai genitori che valutavano il comportamento, il temperamento e le funzioni esecutive dei bambini. Nel caso dell'intelligenza questa è stata vagliata tramite la Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence quarta edizione, somministrata direttamente ai bambini. I risultati suggeriscono che

la struttura anatomica del cervello alla nascita possa influire sulle capacità cognitive a 4/7 anni in caso di bambini molto pretermine, ma la gravità di eventuali deficit è variabile a seconda dell'ambiente domestico in cui il bambino cresce e viene stimolato [105].

Wheelock et al. [108] hanno analizzato, in bambini nati prematuramente, la correlazione tra un'alterata connettività funzionale, all'età equivalente al termine, e lo sviluppo motorio a 12 anni d'età corretta, valutato tramite la Movement Assessment Battery for Children, 2° edizione. I bambini sono stati reclutati se nati a meno di 32 settimane gestazionali e confrontati con un gruppo di controllo formato da bambini nati a termine (37-41 settimane). Entrambe le coorti sono state sottoposte poi a una risonanza magnetica a termine o ad età equivalente per i prematuri. La connettività funzionale a riposo è stata estratta utilizzando 288 regioni di interesse ordinate sulla base di 15 reti funzionali (che coprivano tutto l'encefalo compreso il cervelletto), tramite correlazioni di Pearson eseguite a coppie [109] (Figura 15).

I risultati evidenziano che i bambini nati a termine possiedono associazioni coerenti tra la connettività della rete subcorticale-motoria e i punteggi motori, a differenza dei bambini nati pretermine, i quali hanno dimostrato una connettività cerebrale, associata al comportamento motorio (con punteggi effettivamente inferiori rispetto ai controlli), in un insieme di reti ampiamente distribuito, tra cui: la rete frontoparietale, i gangli della base, la rete di attenzione dorsale, il default mode network, il cervelletto e le reti uditive. Hanno evidenziato, invece, una connettività cerebrale ridotta con la rete sottocorticale motoria. Questi risultati sembrano suggerire un'architettura di rete atipica su cui si basa la funzione motoria nei bambini nati pretermine, confermando la presenza di alterazioni nella connettività cerebrale rispetto ai bambini a termine, che possono riflettersi nelle difficoltà motorie osservate. Per le abilità motorie relative all'equilibrio, invece, le relazioni tra i network e il comportamento riscontrate nel gruppo di prematuri appaiono analoghe a quelle riscontrate nel gruppo di controllo, suggerendo un'architettura di rete preservata solamente per questo specifico aspetto.

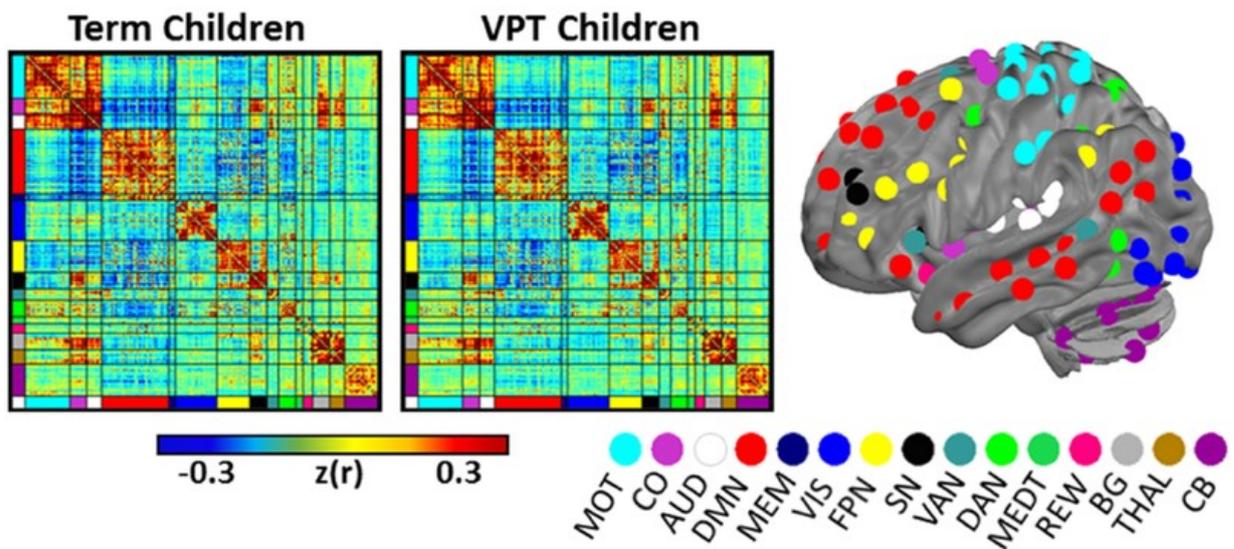


Figura 15: matrici di connettività funzionale riferite a bambini pretermine a destra e a termine a sinistra. La ROI associate ai valori nelle matrici sono suddivise in 15 reti, riportate in una rappresentazione cerebrale, con colori differenti, a seconda del loro posizionamento spaziale: “MOT, motorio; CO, cingulo-opercolare; AUD, uditivo; DMN, default mode network; MEM, Memoria; VIS, visivo; FPN, rete frontoparietale; SN, rete di salienza; VAN, rete di attenzione ventrale; DAN, rete di attenzione dorsale; MEDT, temporale mediale; REW, ricompensa; BG, gangli della base; THAL, Talamo; CB, cervelletto” [108][109].

Nell’ambito degli studi che si avvalgono dell’utilizzo della spettroscopia nel vicino infrarosso, nel 2022 è stata eseguita un’indagine [110] che valutava la presenza di una relazione tra l’ossigenazione cerebrale e lo sviluppo neurologico in bambini prematuri privi di lesioni cerebrali. Nello specifico si è indagata la correlazione tra la bassa concentrazione di ossigeno in regioni cerebrali (rScO₂), misurata con un monitoraggio durato per più di 10h eseguito nei primi 3 giorni di vita, e lo sviluppo neurologico valutato ai 24 mesi di età corretta tramite le scale Bayley III (cognitiva, motoria e linguistica), soppesando anche il livello di istruzione della madre considerato come assenza o presenza di una laurea. I 128 neonati facenti parte della coorte sono stati reclutati se nati prima di 28 settimane o se presentavano un peso alla nascita minore di 1000g.

I risultati conseguiti, riportati nella Figura 16, dimostrano che bassi rScO₂ durante il monitoraggio NIRS, espressi come valori inferiori al 55% per un tempo maggiore di 10h, erano correlati con punteggi inferiori nella valutazione dello sviluppo (queste evidenze sono state riscontrate anche in studi ulteriori [111]–[113]) [110].

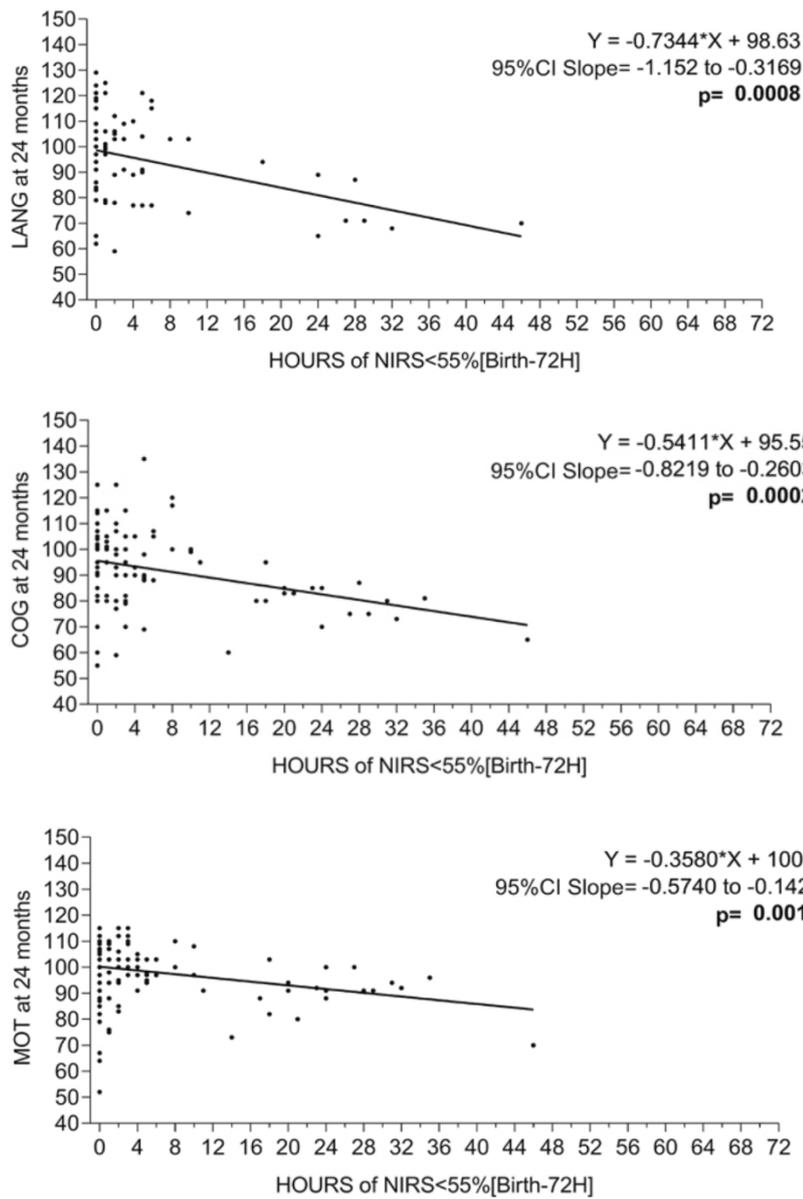


Figura 16: La durata (h) della saturazione di ossigeno cerebrale regionale inferiore al 55% durante i primi 3 giorni di vita e i punteggi di sviluppo neurologico all'età corretta di 24 mesi nei neonati senza lesioni cerebrali; LANG= linguaggio, COG= cognitivo, MOT=moorio.[110].

CAPITOLO 3: SCOPO DELLA TESI E IPOTESI DI RICERCA

3.1 Scopo della tesi

Lo scopo di questo studio è quello di verificare la presenza di un'eventuale correlazione tra la connettività funzionale allo stato di riposo alla nascita e gli indici comportamentali, misurati durante i follow-up a 12 e 24 mesi d'età corretta, per delineare precocemente potenziali percorsi di sviluppo utilizzando una valutazione che non richieda procedure invasive.

Durante la prima settimana di vita, a meno di 48h dalla nascita, i neonati molto ed estremamente prematuri senza lesioni cerebrali, reclutati per questa ricerca, sono stati sottoposti a un monitoraggio continuo della glicemia (CGM) e ad un'acquisizione dell'attività cerebrale, da un minimo di 20h a un massimo di 6 giorni, effettuata mediante la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso a luce continua.

All'età corretta di 12 e 24 mesi è stato poi valutato, sugli stessi pazienti, il funzionamento della memoria di riconoscimento visivo e dell'attenzione visiva, ed è stata effettuata un'analisi del livello di maturazione cognitivo, linguistico, motorio e socioemozionale.

Questo dataset è unico al mondo e non ne esiste uno simile in letteratura, per tanto è necessario individuare le potenzialità contenute nei dati e nelle metodologie, al fine di estrarre tutte le informazioni in essi contenute, varando tutte le possibilità e allo stesso tempo considerando eventuali limitazioni e criticità insite. Il progetto, in realtà, è nato con lo scopo di individuare i benefici a lungo termine di una terapia, basata sulle misurazioni glicemiche, che interviene continuamente nel mantenere i livelli di glucosio nel range di normalità, a differenza di quella attualmente in uso che corregge tali livelli sfruttando due campionamenti al giorno.

In questa tesi, invece, l'obiettivo è quello di discriminare possibili reti funzionali alla nascita, presenti fin da subito, che mostrano un'associazione con i punteggi ottenuti nella valutazione dello sviluppo ai 12 e 24 mesi di età corretta, per soppesare la possibilità di usare la connettività funzionale alla nascita come biomarker di possibili deficit nello sviluppo del bambino.

Per raggiungere questo obiettivo, sono stati calcolati i valori della connettività funzionale (FC) dai dati rilevati con la NIRS, misure che si basano sulle variazioni a bassa frequenza nel segnale dipendente dalla saturazione di ossigeno nel sangue in grado di riflettere l'attività del cervello, acquisita durante lo stato di riposo del paziente quando non sta svolgendo un compito,

condizione sempre ipotizzabile in un neonato di pochi giorni. La connettività funzionale allo stato di riposo viene estratta durante il primo periodo ottimale di euglicemia, in quanto è noto che gli eventi glicemici possono modificare l'emodinamica cerebrale, creando possibili sofferenze in alcune aree del cervello. La scelta del primo intervallo disponibile viene effettuata al fine di escludere il successivo possibile impatto delle variazioni glicemiche estreme sulla connettività cerebrale.

Il campione attualmente disponibile nel dataset consta di 47 pazienti e di questi, 41 sono stati selezionati ed analizzati nel presente lavoro di tesi.

In questa tesi, il primo obiettivo è quello di realizzare un codice in grado di processare i dati misurati con il CGM, al fine di individuare i periodi in cui il paziente è in euglicemia e di conseguenza le finestre ottimali in cui calcolare la connettività a riposo alla nascita. Il secondo obiettivo è quello di realizzare un algoritmo in grado di analizzare i dati NIRS misurati, valutando la finestra migliore in cui calcolare la connettività in base a dei criteri volti ad ottimizzarne il calcolo in base alla qualità del dato NIRS, identificando la pipeline di analisi dati migliore, inclusa la correzione degli artefatti da movimento, per il dato a disposizione, e risolvendo il problema inverso per la ricostruzione delle immagini di emodinamica cerebrale usando un atlante di teste di prematuri. Il terzo obiettivo, quello primario, è quello di valutare le possibili correlazioni tra i pattern di connettività e gli indici comportamentali calcolati ai follow-up a 12 e 24 mesi di età corretta, che includono valutazioni dell'efficienza dell'attenzione visiva, della capacità di memoria visiva e del livello di sviluppo cognitivo, motorio, linguistico e socio-emozionale. Attenzione e memoria sono dei precursori delle funzioni esecutive, che in letteratura sono emerse come deficitarie nella popolazione prematura al raggiungimento dell'età prescolare (4-5 anni). In questa analisi, verranno valutate anche possibili differenze nei pattern di connettività tra gruppi di pazienti, divisi in base ai loro punteggi alle scale Bayley (se nel range di normalità oppure sopra o sotto tale range). L'utilizzo di un approccio multi-metodo permette di ottenere un quadro più completo volto alla discriminazione precoce di eventuali deficit o difficoltà.

Il fine ultimo del presente studio sarebbe quello di individuare già dai pattern dell'attività cerebrale alla nascita un legame con uno sviluppo deficitario in uno specifico dominio all'avanzare dell'età con una probabilità ad esso associata, in modo tale da intervenire anticipatamente utilizzando adeguati fattori ambientali o terapie mediche in grado di aiutare il

bambino, arginando fin da subito l'insorgenza di eventuali problematiche o per lo meno riducendone l'impatto.

CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI

4.1 Dataset

Questo studio presenta un dataset unico, ottenuto attraverso una collaborazione tra il Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione e il Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova, comprendente dati raccolti a partire da marzo 2020 relativi all'andamento glicemico e all'emodinamica cerebrale di neonati prematuri ricoverati in terapia intensiva neonatale presso l'Azienda Ospedaliera-Università di Padova durante la loro prima settimana di vita. Una seconda parte di dati viene acquisita quando i neonati raggiungono i 12 e 24 mesi di età corretta e include una valutazione dei processi attentivi e della memoria di riconoscimento visivo, oltre ai punteggi riguardanti lo sviluppo globale del bambino misurati attraverso la Scala Bayley III [96].

Lo studio, attualmente, ha raggiunto l'arruolamento di 47 pazienti, selezionati entro le prime 48 ore dalla nascita secondo tre criteri principali: nascita prima delle 32 settimane di gestazione, peso inferiore a 1500 g e l'assenza di patologie note a carico del sistema nervoso e cerebrale. La partecipazione dei pazienti allo studio richiede il consenso informato da parte di entrambi i genitori. Alcuni pazienti sono inclusi nonostante non soddisfino tutti i criteri di selezione a causa di particolari circostanze, ovvero, il peso alla nascita che rientra nelle specifiche sebbene le settimane di gestazione siano maggiori o viceversa, ad esempio il caso dei pazienti 19 e 25 riportati nella tabella sottostante.

Tra questa coorte di pazienti i primi 41, presentati in Tabella 1, hanno raggiunto l'età idonea per sottoporsi al follow-up a 12 mesi di età corretta e all'interno di questo sottogruppo i primi 28 partecipanti hanno altresì raggiunto l'età per il follow-up a 24 mesi di età corretta.

	SESSO 0 F;1 M	SG (sett)	PN (gr)	SGA 0 no;1 si	CC (cm)	PARTO 0 V;1 TC	DIABETE MATERNO 0 no; 1 si	NAZIONALITA' GENITORI	LINGUA GENITORI
PD 1	1	29+5	1.300	0	27,5	1	0	Albania	Italiana/Albanese
PD 2	1	29+2	1.340	0	28,8	1	1	Italia	Italiana
PD 3	0	29+2	1.300	0	28,0	1	1	Nigeria	Inglese/Italiana

PD 4	0	31+3	1.170	0	27,4	1	1	Bangladesh	Bengalese
PD 5	0	33+1	1.231	0	27,5	1	0	Romania	Rumeno
PD 6	1	26+4	920	0	23,2	1	0	Italia	Italiana
PD 7	1	30+5	2.390	0	30,4	0	1	Italia	Italiana
PD 8	0	31+0	1.485	0	27,0	0	0	Italia	Italiana
PD 9	1	26+2	690	1	23,0	1	0	Ghana	Ghanese/Inglese
PD 10	0	30+6	1.530	0	29,0	1	0	Italia	Italiana
PD 11	1	31+2	2.020	0	31,5	1	0	Romania	Rumeno
PD 12	0	24+1	610	0	22,0	1	0	Romania	Rumeno
PD 13	0	31+4	1.370	0	29,0	1	0	Macedonia	Macedone/Italiana
PD 14	1	29+5	880	1	25,5	1	1	Italia	Italiana
PD 15	1	32+6	1.485	1	28,0	1	0	Italia	Italiana
PD 16	0	30+0	1.040	1	26,0	1	0	Italia	Italiana
PD 17	1	28+3	1.170	0	25,0	0	0	Italia	Italiana
PD 18	1	32+3	1.315	1	29	1	0	Italia	Italiana
PD 19	1	35+1	690	1	21,5	1	0	Nigeria	Inglese
PD 20	1	30+0	1.310	0	28,0	1	0	Italia	Italiana
PD 21	0	32+0	1.490	0	28	1	0	Italia	Italiana
PD 22	0	31+1	1.220	0	27,5	1	0	Italia	Italiana
PD 23	1	31+4	1.450	0	29,5	1	0	Italia	Italiana
PD 24	1	31+5	1.810	0	31,5	1	0	Italia	Italiana
PD 25	1	30+6	1.760	0	29,5	0	0	Italia	Italiana
PD 26	1	26+3	730	0	24,0	1	0	Italia	Italiana
PD 27	0	32+3	1.320	1	26	1	1	Italia	Italiana
PD 28	0	31+5	1.560	0	30,0	1	0	Italia	Italiana
PD 29	0	27+4	660	1	24	1	1	Romania	Rumeno/Italiana
PD 30	1	28+3	835	1	25	1	0	Italia	Italiana
PD 31	1	29+1	1.450	0	23	1	0	Italia	Italiana
PD 32	0	31+5	2.000	0	28	0	0	Marocco	Italiana/Marocchina
PD 33	0	31+1	1.360	0	28,0	1	0	Italia	Italiana
PD 34	0	31+3	1.776	0	28,5	0	1	Italia	Italiana
PD 35	0	32+0	1.230	1	29,0	1	1	Marocco	Marocchina/Italiana
PD 36	1	29+4	1.040	0	26,0	1	0	Nigeria	Inglese/Italiana
PD 37	1	29+1	1.110	0	27,5	1	0	Italia	Italiana
PD 38	1	31+1	1.435	0	29,0	1	0	Italia	Italiana
PD 39	1	31+0	1.510	0	29,0	1	1	Italia	Italiana
PD 40	1	29+3	1.680	0	29,0	1	1	Italia	Italiana

PD 41	0	31+2	1.900	0	29,0	1	1	Cina	Cinese
-------	---	------	-------	---	------	---	---	------	--------

Tabella 1: Caratteristiche dei partecipanti, comprende le variabili relative: al genere, alla settimana di gestazione (SG), al peso alla nascita (PN in grammi), alla condizione di essere piccoli per l'età gestazionale (SGA), alla circonferenza cranica (CC in cm), al tipo di parto (V per vaginale o TC per cesareo), alla presenza di diabete materno, alla nazionalità dei genitori e alla lingua dei genitori. I pazienti evidenziati in grigio chiaro sono stati esclusi dalle analisi a causa di una registrazione non adeguata dei dati CGM.

4.1.1 Monitoraggio glicemico ed emodinamico alla nascita

Per il monitoraggio glicemico, viene utilizzato un sensore CGM (Continuous Glucose Monitoring) proveniente da due diverse aziende produttrici, rispettivamente Medtronic (Medtronic Minimed, Northridge, CA, USA) e Dexcom Inc. (San Diego, CA, USA), a seconda della loro disponibilità al momento del reclutamento del partecipante. Il sensore viene posizionato sulla coscia dei neonati entro 48 ore dalla nascita.

Il periodo di acquisizione dei dati varia da 1 a 5 giorni a seconda delle condizioni cliniche dei pazienti. Il sensore registra il livello di glicemia ogni 5 minuti e per evitare errori sistematici di misurazione, almeno due volte ogni giorno viene eseguita una ricalibrazione del dispositivo.

In questa indagine, è opportuno notare che otto partecipanti (identificati come i soggetti 18, 21, 27, 29, 30, 31, 32 e 46 in Tabella 1) sono esclusi a causa di un'interruzione nella registrazione del segnale glicemico. Le interruzioni nel monitoraggio possono essere dovute a problemi tecnici che implicano la sostituzione del dispositivo aumentando il rischio di infezione, oppure al trasferimento dei pazienti.

In questo elaborato di tesi il tracciato CGM verrà utilizzato principalmente per identificare i momenti, all'inizio dell'acquisizione, in cui il paziente si trova in euglicemia, per calcolare i network di resting-state in un momento di stabilità glicemica. Non verranno analizzati successivamente gli eventi di ipo e iperglicemia presenti nel tracciato, in quanto non pertinenti con lo scopo della tesi.

Per il monitoraggio dell'emodinamica cerebrale, si utilizza una cuffia NIRS (*Near-Infrared Spectroscopy*) con un sistema NTS (*Gowerlabs, UK*) che impiega laser di classe 1 a due lunghezze d'onda (780 e 850 nm) per misurare l'attività cerebrale. Questo sistema è configurato con cura, consiste di 8 sorgenti e 8 rilevatori ottici posizionati in alcune delle posizioni definite

dal sistema internazionale elettroencefalografico 10-5 (vedi Figura 17). Questa configurazione specifica consente la creazione di un totale di 64 canali di monitoraggio per ciascuna lunghezza d'onda, garantendo una copertura estensiva delle regioni corticali cerebrali. È fondamentale sottolineare che questa scelta di configurazione è stata ponderata con attenzione, tenendo conto sia della posizione supina dei neonati sia delle limitazioni legate all'ingombro della cuffia utilizzata.

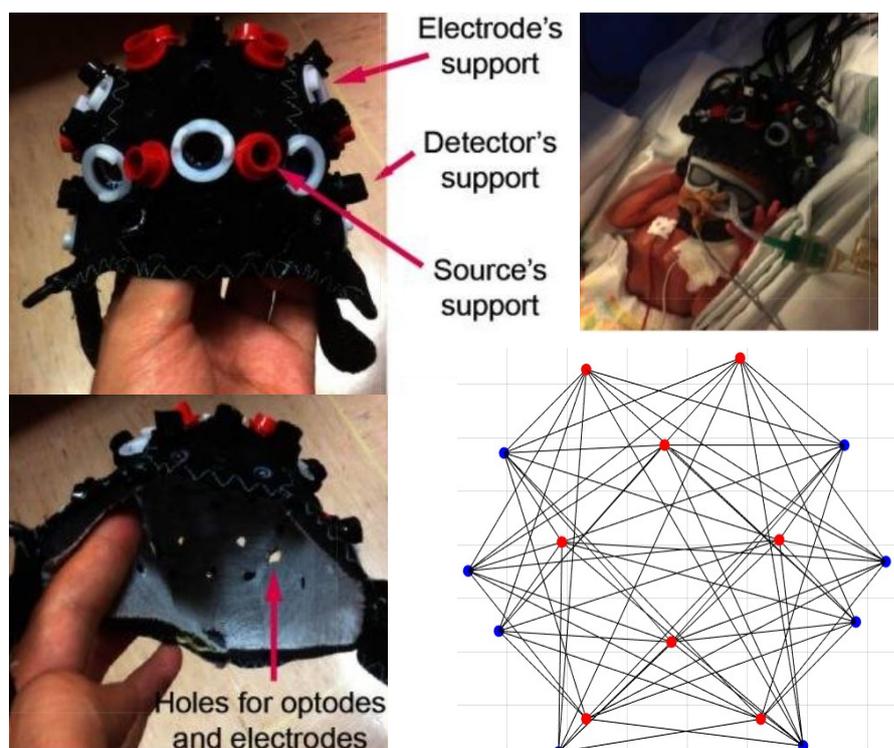


Figura 17: Nella sequenza da sinistra a destra dall'alto al basso: 1) componente esterno della cuffia NIRS, dotato del supporto per gli optodi e gli elettrodi. 2) cuffia collocata sulla testa del neonato, con tutte le fibre correttamente connesse 3) assemblaggio del componente esterno ed interno, uniti insieme per formare la cuffia. 4) rappresentazione schematica degli optodi e dei canali, in rosso le sorgenti e in blu i rilevatori. Preso da [23].

4.1.2 Follow up a 12 e 24 mesi di età corretta

Tra i 41 bambini che hanno raggiunto la soglia di età appropriata per il follow-up a 12 mesi di età corretta solo 29 sono stati sottoposti a valutazioni relative ai processi attentivi e alla memoria di riconoscimento visivo (Tabella 2), presso gli ambulatori della Clinica Pediatrica dell'Azienda Ospedale-Università di Padova. Questa disamina viene condotta attraverso

l'impiego di due paradigmi sperimentali al computer, nello specifico il *Gap-Overlap*, ispirato ad un articolo di Ballieux et al.[4] e il *Simultaneous Stream Change Detection Task* [5], con un ordine di presentazione controbilanciato tra i partecipanti. Inoltre, vengono eseguite le Scale Bayley III, che prevedono dei giochi e compiti specifici da far fare al bambino, permettendo l'assegnazione dei punteggi complessivi relativi allo sviluppo includendo i domini cognitivo, linguistico, socio-emozionale e motorio [96].

Nel caso del follow-up a 24 mesi l'insieme dei partecipanti si riduce a 18 pazienti (Tabella 2). L'effettiva riduzione del numero di partecipanti è causata dalla decisione di abbandonare lo studio da parte di alcuni genitori (3 pazienti) o a causa del decesso dei pazienti prima del compimento dei 12 mesi di età corretta. Inoltre, non tutti i pazienti, sia a 12 che 24 mesi, hanno effettuato un test valido: per essere considerato valido, il paziente deve aver discernuto almeno un numero minimo di trial per condizione sperimentale.

	12 MESI			24 MESI		
	Gap Overlap	VSTM	Bayley	Gap Overlap	VSTM	Bayley
PD 1						
PD 2						
PD 3						
PD 4						
PD 5						
PD 6						
PD 7						
PD 8						
PD 9						
PD 10						
PD 11						
PD 12						
PD 13						
PD 14						
PD 15						
PD 16						
PD 17						
PD 19						
PD 20						
PD 22						
PD 23						
PD 24						

PD 25						
PD 26						
PD 28						
PD 33						
PD 34						
PD 35						
PD 36						
PD 37						
PD 38						
PD 39						
PD 40						
PD 41						

Tabella 2: Partecipazione dei pazienti ai test di follow-up a 12 e 24 mesi di età corretta: in rosso test non eseguito in verde test eseguito, in grigio pazienti che non hanno raggiunto l'età corretta per eseguire il test. (PD14 Test Gap-Overlap: Valutazione mancante a causa di registrazione video assente).

I dati ai 12 mesi di età corretta sono stati raccolti presso le stanze ambulatoriali dei reparti di Diabetologia e di Pediatria dell'Azienda Ospedaliera di Padova, nel periodo compreso tra il 9 giugno 2021 e il 2 maggio 2023. L'attrezzatura utilizzata per somministrare i due paradigmi sperimentali consiste in un monitor per la proiezione degli stimoli, un laptop che ospita il programma E-prime per la presentazione degli stimoli selezionati dal database NOUN (*Novel Object and Unusual Name*)[114] e una videocamera connessa a un laptop collegato al monitor. La videocamera acquisisce i movimenti oculari del bambino durante la somministrazione dei paradigmi e consente la visualizzazione sia dei contenuti proiettati sul monitor che delle azioni del bambino. La durata media di somministrazione per ciascun paradigma, in entrambe le condizioni sperimentali, è di circa 4 minuti, all'inizio dei quali viene sempre presentato uno stimolo centrale per richiamare l'attenzione del bambino sullo schermo. La codifica dei movimenti saccadici, a sua volta, viene effettuata attraverso l'utilizzo del programma VirtualDub.

Il paradigma del Gap-Overlap, per lo studio dell'attenzione visiva, prevede una condizione "Gap" in cui lo stimolo centrale scompare prima dell'apparizione dello stimolo periferico, e una condizione "Overlap", in cui lo stimolo periferico appare mentre quello centrale rimane al centro dello schermo (Figura 18). Il test è stato selezionato per valutare la capacità dei bambini

nati prematuramente di disancorare l'attenzione da uno stimolo precedente verso uno nuovo, in quanto la letteratura scientifica indica che questi bambini spesso manifestano difficoltà nella transizione da un input visuale all'altro.

I partecipanti vengono valutati tramite 4 blocchi di 30 trial randomici, suddivisi in 15 condizioni "Gap" e 15 condizioni "Overlap" con la posizione degli stimoli (a destra o a sinistra rispetto a quello centrale) variata in modo casuale e bilanciato. Un trial viene considerato valido se le saccadi compiute dal bambino per spostarsi dallo stimolo centrale a quello laterale hanno una latenza maggiore ad 80 ms e inferiore a 1000 ms; inoltre è necessario che il bambino guardi lo stimolo di fissazione centrale prima della comparsa dello stimolo bersaglio. I dati relativi ai trial validi per ciascuna condizione e le medie delle latenze saccadiche (cioè, il tempo impiegato dal bambino per spostare lo sguardo dallo stimolo centrale a quello laterale) nelle condizioni "Gap" e "Overlap" sono documentati in una tabella Excel. In aggiunta, viene registrato un indicatore noto come "effetto Gap" [115] in una quarta colonna. Questo indicatore offre un'analisi relativa alla propensione di questi bambini a spostare la loro attenzione dall'input iniziale in modo più celere durante la condizione di "Gap", in cui il secondo stimolo si verifica in seguito a un periodo di assenza di stimoli, rispetto alla condizione di "Overlap", in cui il secondo stimolo viene presentato successivamente, ma a lato del primo.

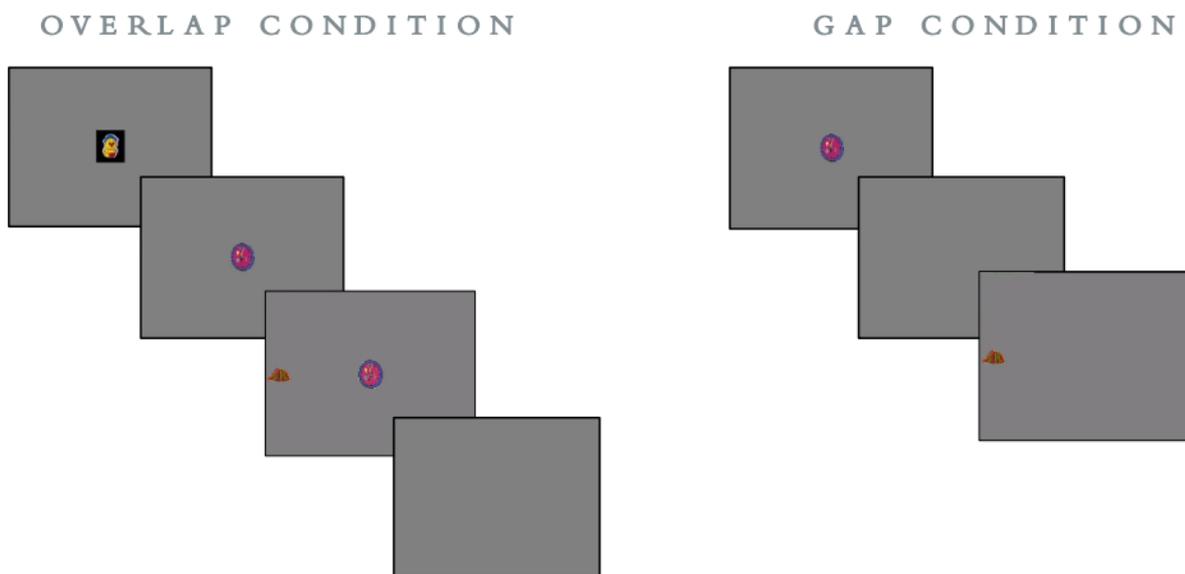


Figura 18: Nella condizione di Gap lo stimolo di fissazione centrale è visibile per un periodo di circa 1300ms, dopodiché lo schermo rimane vuoto per 200ms, subito dopo appare lo stimolo periferico, posizionato casualmente

a destra o a sinistra che rimane visibile per 1500ms, prima di scomparire. Nella condizione di Overlap lo stimolo centrale è visibile per circa 1500ms, e successivamente, lateralmente (a destra o a sinistra, in modo casuale), appare lo stimolo periferico. Entrambi gli stimoli rimangono visibili sullo schermo per circa 1500ms.

Il paradigma del *Simultaneous Stream Change Detection Task* valuta la memoria di riconoscimento visivo del bambino con confronti di coppie di immagini [116], [117] ed è anch'esso suddiviso in blocchi di stimoli, a numerosità variabile, mostrati in due riquadri bianchi sul monitor (vedi Figura 19). In modo casuale, in uno dei due riquadri vengono proiettati stimoli fissi, quindi sempre uguali (“no changing”), mentre nell'altro riquadro vengono proiettati stimoli che cambiano ad ogni trial (“changing”). In una tabella Excel vengono registrati il tempo totale di fissazione (quanto a lungo guarda gli stimoli durante l'intero blocco) ed il tempo di fissazione sugli stimoli variabili (quanto a lungo guarda gli stimoli del flusso variabile, rispetto alla durata totale di fissazione), espresso in percentuale, per le sotto-condizioni: “Set Size 1”, dove gli stimoli sono uno per riquadro, e “Set Size 2”, dove gli stimoli sono due per riquadro. Questo permette di valutare la capacità di memoria visiva del bambino. Se il bambino guarda di più gli stimoli variabili, questo implica che è attratto dalla novità e si ricorda lo stimolo della schermata precedente, denotando una capacità di memoria di uno o due item.

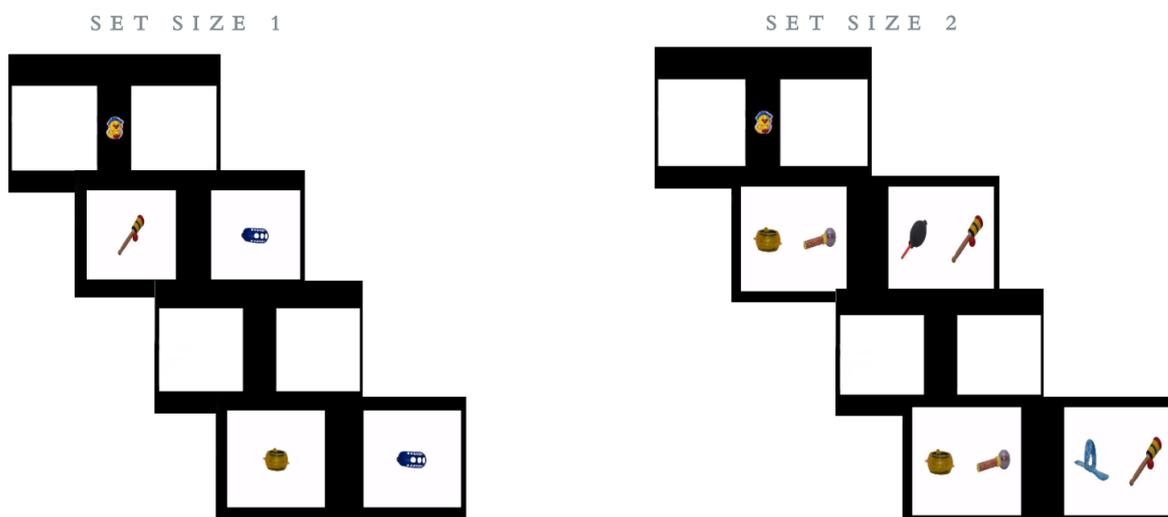


Figura 19: Nella condizione denominata “Set Size 1” uno stimolo è costantemente visualizzato a destra (in questo caso) per tutto il gruppo di trial, mentre a sinistra appare uno stimolo nuovo per 500ms. Successivamente, uno

schermo vuoto compare per 300ms e quindi il modello si ripete, con uno stimolo costante a destra e uno nuovo a sinistra per 500ms. Questo schema continua fino alla fine del gruppo di trial.

Nella condizione “Set Size 2”, sempre a sinistra, uno stimolo rimane costante, mentre a destra uno dei due stimoli cambia durante la presentazione. I tempi di esposizione degli stimoli sono uguali a quelli della condizione “Set Size 1”. Preso da [5].

Ai 24 mesi di età corretta, i pazienti sono stati testati presso il Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione. La procedura seguita per il testing è stata uguale a quella eseguita ai 12 mesi di età corretta, con alcune piccole variazioni. Innanzitutto, la complessità del paradigma per lo studio della memoria visiva è aumentata e la struttura è stata modificata. In questo caso, i bambini sono esposti a due o tre stimoli colorati (aumentando quindi il testing della probabile capacità di memoria rispetto ai 12 mesi di età corretta). Viene presentata una prima schermata contenente due o tre quadrati colorati in posizione specifiche (Figura 20) e dopo la presentazione di una schermata grigia, vengono ripresentati i quadratini colorati in un'altra schermata. In tale schermata, uno o due quadratini colorati, rispettivamente per il “Set Size 2” e “Set Size 3” rimangono fissi mentre un quadratino colorato cambia colore. È importante notare che tutti gli stimoli nella seconda schermata vengono spostati leggermente a lato per una migliore osservazione della saccade del bambino, mentre nella prima schermata sono più ravvicinati al centro per permetterne una più facile memorizzazione dei colori presentati. Le metriche che vengono calcolate riguardano se il bambino guarda più a lungo i quadratini con colore costante o quello che ha cambiato colore nella seconda schermata.

Nel documento Excel che raccoglie i risultati del test, sono documentate le sotto-condizioni “Set Size 2” e “Set Size 3” utilizzando lo stesso approccio dei dati registrati a 12 mesi. Inoltre, una quarta colonna è stata aggiunta per indicare l'assenza di una preferenza per il cambiamento nel “Set Size 3”.

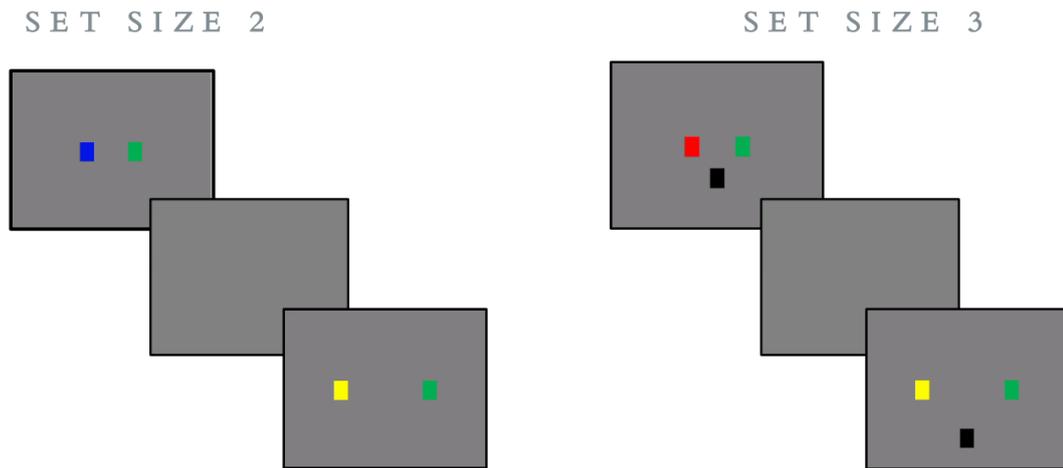


Figura 20: Nella condizione “Set Size 2”, due stimoli rappresentati da rettangoli di colori differenti vengono presentati per 500ms. Successivamente, uno schermo vuoto appare per 300ms, dopodiché i rettangoli vengono di nuovo visualizzati per altri 1500ms, questa volta distanziati l’uno dall’altro, e uno dei due cambia colore. Questo ciclo si ripete per l’intera serie di trial. Nella condizione “Set Size 3”, la procedura è simile, ma vengono presentati tre stimoli anziché due. Tuttavia, solo uno dei tre stimoli cambia colore durante la presentazione di ogni gruppo di trial.

Per quanto riguarda la somministrazione delle Scale Bayley, sia a 12 che 24 mesi di età corretta, è stato utilizzato un kit fornito dall’Azienda Ospedaliera di Padova che comprende il manuale di istruzioni per la somministrazione degli item, tabelle normative per la valutazione dei punteggi nelle diverse sottoscale, materiali di gioco e un questionario sullo sviluppo socio-emozionale del bambino, somministrato e compilato dal caregiver. Nell’ambito di questa analisi, si prendono in considerazione i punteggi composti, rappresentati su una scala espressa in centesimi per ogni aspetto: cognitivo, del linguaggio, motorio e socio-emozionale. In questa scala, un punteggio compreso entro il range di 100 +/- 15 viene considerato rappresentativo della normalità, un punteggio inferiore a questo intervallo indica la presenza di un deficit, mentre un punteggio superiore indica un’abilità maggiore rispetto alla norma.

L’elaborazione dei dati è stata condotta utilizzando il software MATLAB e diverse funzioni implementate per l’analisi dei segnali CGM e NIRS sono in parte contenute nei pacchetti *HOMER2*, *iso2mesh-master*, *NIRFASTer-master*, *Robust-Correlations-2*.

I risultati ottenuti fino a questo momento sono limitati a causa del numero ridotto di pazienti, ma si auspica che ulteriori reclutamenti possano portare ad analisi statisticamente significative e più robuste.

4.2 Analisi glicemica

Nell'ambito dell'analisi glicemica è stata impiegata la piattaforma software MATLAB con l'obiettivo di identificare gli intervalli di euglicemia durante i quali è plausibile supporre che il neonato si trovi in uno stato di riposo fisiologico (resting-state). In questa prospettiva, gli eventi di iperglicemia e ipoglicemia sono considerati come compiti (task).

Il processo di analisi inizia con il caricamento dei dati da fogli Excel ciascuno relativo a un singolo paziente e contenente informazioni quali data, ora dell'acquisizione e corrispondenti valori glicemici rilevati. Nel caso in cui l'acquisizione rappresenti una calibrazione del dispositivo è presente una colonna che riporta accanto al singolo valore un marcatore: "CGM calibration" o un altro simile. È sostanziale tenere in considerazione che le acquisizioni dati sono effettuate da diversi operatori e non seguono uno stesso formato; pertanto, è stata condotta una preelaborazione dei dati (Figura 21).

giorno	ora	mg/dL	Time	mg/dL	flag
1/25/21	16:11:21	99,00	13/05/2020 12:09	121	
1/25/21	16:06:21	94,00	13/05/2020 12:13	102	CGM calibration
1/25/21	16:01:21	88,00	13/05/2020 12:14	102	CGM calibration
1/25/21	15:56:21	83,00	13/05/2020 12:14	111	
1/25/21	15:51:21	79,00	13/05/2020 12:19	112	

Figura 21: Esempi di acquisizioni dati in formati differenti da due dispositivi CGM: PD23 a destra e PD10 a sinistra. Si noti che a destra è presente una colonna con le informazioni sulla ricalibrazione, mentre a sinistra non è presente tale informazione. Inoltre, è evidente una differenza nel modo in cui la data e l'ora sono registrate: a sinistra, sono in un formato diverso e sono separate in colonne distinte, mentre a destra questa separazione non è presente. Questi esempi illustrano la variabilità nei formati di acquisizione dati CGM, che può influire sulla loro gestione.

I fogli Excel sono caricati uno alla volta e l'analisi viene condotta su ciascun foglio separatamente con il salvataggio dei risultati del singolo paziente prima del caricamento del foglio successivo, al fine di ottimizzare l'esecuzione del codice.

In seguito al caricamento dei dati viene effettuato un controllo del formato che include l'unione delle colonne separate contenenti data e ora nel caso in cui fossero presenti entrambe. Inoltre, se la lettura automatica della colonna restituisce i dati in formato stringa questi vengono convertiti nel formato tempo e nell'eventualità in cui l'acquisizione dei dati sia stata effettuata in ordine decrescente rispetto all'orario la tabella viene invertita per l'analisi successiva, mentre se l'acquisizione dei dati è avvenuta in modo non sequenziale, è nodale eseguire un processo di riordinamento. Questa problematica specifica si manifesta quando le date acquisite sono presenti in formato parzialmente americano e parzialmente europeo. L'eterogeneità nei formati di data può comportare ambiguità e difficoltà nell'interpretazione automatica del software e richiede l'adozione di procedure di standardizzazione o conversione delle date per garantire la coerenza nella manipolazione dei dati temporali.

Un ulteriore controllo riguarda i dati relativi alla glicemia in formato numerico, i quali possono essere caricati come stringhe a causa dell'uso della virgola come separatore delle cifre decimali nei fogli Excel.

Le righe relative alle ricalibrizioni vengono escluse dall'analisi in quanto non sono considerate parte del campionamento glicemico.

Il codice prosegue eseguendo una funzione dedicata all'individuazione e correzione degli errori definiti come acquisizioni che non rispettano intervalli temporali di 5 minuti tra i campionamenti e possono essere suddivisi in due categorie principali. La prima categoria viene identificata quando si rileva la presenza di dati acquisiti nello stesso istante o quando la differenza di tempo tra la misurazione precedente e la successiva (rispetto a quella corrente) è pari a 5 minuti. L'errore viene attribuito, nel caso in cui non sia disponibile una colonna contenente il codice di ricalibrazione, a questa assenza e la riga corrispondente viene eliminata senza la perdita di informazioni significative; mentre nel caso in cui la colonna di ricalibrazione è presente l'errore viene ignorato. La decisione di eliminare la riga corrente anziché quella immediatamente successiva è motivata dalla presenza dei marcatori, nel caso di fogli Excel che li contengono, che precedono sistematicamente l'effettiva acquisizione del dato quando si verifica una concordanza temporale all'orario indicato (questo fenomeno è chiaramente illustrato nella Figura 21). È rilevante notare che, dopo il controllo, esclusivamente nelle

acquisizioni dove è presente la colonna con il marcatore, gli errori di questa tipologia non si verificano nei dati perché sono già stati eliminati precedentemente.

La seconda categoria di errore riguarda i dati mancanti, ovvero un intervallo temporale in cui non sono state effettuate registrazioni, denominato *gap temporale*; il quale viene suddiviso in intervalli di 5 minuti a partire dalla data dell'ultima registrazione effettuata. Per ciascun campione mancante individuato viene attribuito un valore glicemico provvisorio calcolato come la media tra l'ultimo valore registrato prima del gap e il primo valore registrato dopo il gap.

In seguito, viene eseguita una funzione per verificare l'assenza di ulteriori errori nei dati, eventuali *gap temporali* con una durata inferiore a 10 minuti vengono ignorati poiché non comportano l'inserimento di nuovi campioni e non compromettono l'integrità complessiva dei dati.

Dopo aver effettuato la correzione vengono identificati gli indici che caratterizzano gli estremi degli eventi glicemici e degli intervalli di euglicemia seguendo criteri di validità descritti in seguito. Solo a questo punto è possibile valutare la durata dei *gap* temporali e nel caso in cui l'interruzione sia di breve durata, i campioni vengono corretti mediante un processo di interpolazione dei dati seguendo il metodo proposto da Fonda e colleghi nel 2013 [118]. La formula utilizzata per calcolare tali valori è la seguente:

$$k + [\text{differenza glicemica} / (\text{numero di incrementi di 5 minuti} - 1)]$$

dove "differenza glicemica" rappresenta la differenza tra i valori glicemici prima e dopo il gap e "k" indica il valore glicemico precedente [118].

L'evoluzione temporale della glicemia è visualizzata in forma grafica, come illustrato nella Figura 22, al fine di consentire una valutazione qualitativa dell'accuratezza del procedimento.

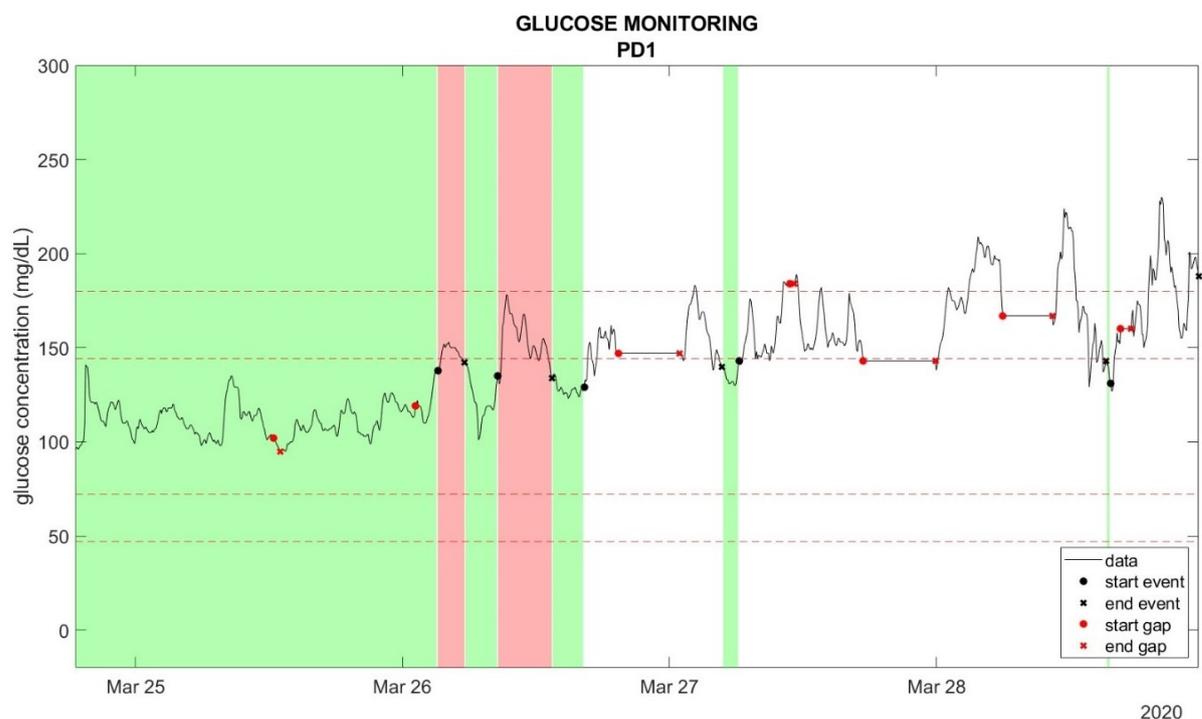


Figura 22: Andamento glicemico del Paziente 1 nel tempo. Le bande rosse evidenziano la presenza di eventi ipoglicemici e iperglicemici, mentre le bande verdi indicano i periodi di euglicemia. Le parti non colorate sono escluse dall'analisi. I punti e le croci nere rappresentano, rispettivamente, l'inizio e la fine di un evento indipendentemente dalla sua validità. I punti e le croci rosse indicano l'inizio e la fine di un gap temporale, anche se è stato corretto.

4.2.1 Criteri per l'individuazione degli eventi e l'euglicemia

La definizione dei criteri per l'individuazione degli eventi glicemici si basa sulla classificazione dei livelli di glicemia come normali (in baseline), iperglicemici, o ipoglicemici.

Come indicato nello studio di Galderisi et al. [119] i livelli di glicemia sono considerati normali quando rientrano nell'intervallo di 72-144 mg/dl, mentre al di sopra di questo intervallo, si presenta un evento iperglicemico e al di sotto un evento ipoglicemico (la severità di un evento può variare in base ai valori raggiunti durante il picco).

La definizione di un evento glicemico richiede la presenza di almeno 3 campioni consecutivi sopra o sotto la soglia, a seconda che si tratti di iperglicemia o ipoglicemia, di conseguenza l'inizio di un evento corrisponde al campione acquisito 15 minuti prima del primo valore fuori dalla soglia e se la variazione di glicemia tra questi due valori è inferiore a 15 mg/dl. In tal caso, la riga contenente data e valore glicemico viene registrata come inizio dell'evento, mentre, in

caso contrario, la finestra temporale di 15 minuti viene retrocessa di un campione e la condizione viene verificata nuovamente; questo processo continua finché il criterio di inizio dell'evento viene soddisfatto.

La determinazione della fine dell'evento segue un approccio simile, ma in questo caso i 15 minuti sono successivi all'ultimo valore fuori dalla soglia e se il criterio non viene soddisfatto la finestra temporale viene spostata in avanti.

È importante notare che tutti gli eventi iniziano e terminano con un periodo di almeno 15 minuti in uno stato di glicemia di base e l'individuazione degli estremi deve rispettare anche questa condizione. Pertanto, se eventualmente un'acquisizione inizia con un evento che non consente di individuare l'inizio secondo i criteri stabiliti, tale evento non viene considerato valido. Inoltre, è possibile che si verifichino eventi parzialmente sovrapposti, che vengono trattati come parte di un singolo evento glicemico.

L'individuazione degli estremi degli intervalli di euglicemia avviene identificando gli intervalli di tempo che non sono stati assegnati alla iper- o ipoglicemia, indipendentemente dalla validità dell'evento.

4.2.2 Valutazione dei *gap* temporali

Dopo aver identificato le fasi di euglicemia è fondamentale valutare la correzione dei *gap temporali*, eventualmente presenti, in modo tale da evitare distorsioni.

Nel caso in cui un *gap* sia parzialmente contenuto all'interno di un evento non valido esso viene completamente compreso nell'evento stesso per evitare distorsioni e di conseguenza gli indici degli intervalli di euglicemia vengono adattati in conformità con questa modifica.

I criteri per l'esclusione degli eventi sono i seguenti: un *gap* temporale maggiore del 30% della durata dell'evento o un *gap* pari/superiore a 60 minuti e in cui la differenza di concentrazione tra i campioni, riferita ai 30 minuti precedenti all'inizio o successivi alla fine del *gap*, superi i 15 mg/dl.

La gestione dei *gap* temporali all'interno degli intervalli di euglicemia segue un approccio differente. Nel caso in cui la durata dei *gap* superi il primo quartile della durata degli eventi glicemici validi tali *gap* non vengono considerati parte dell'euglicemia poiché la probabilità che si sia verificato un evento glicemico significativo all'interno di tale intervallo temporale

non può essere trascurata. Pertanto, in tali casi, è necessario suddividere l'intervallo di euglicemia in due parti che non includano il *gap* temporale.

Nella Figura 22 è possibile visualizzare l'applicazione delle regole sopra descritte sugli eventi.

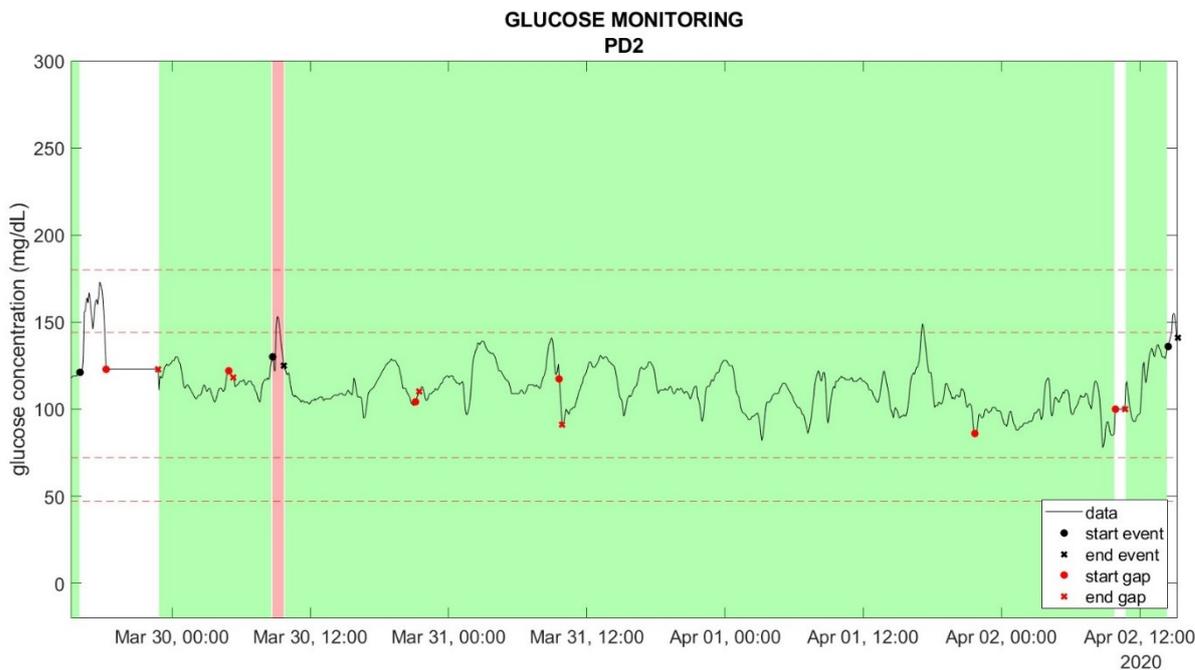


Figura 23: Andamento glicemico di PD2 nel tempo. Le bande rosse evidenziano la presenza di eventi ipoglicemici e iperglicemici, mentre le bande verdi indicano i periodi di euglicemia. Le parti non colorate sono escluse dall'analisi. I punti e le croci nere rappresentano, rispettivamente, l'inizio e la fine di un evento indipendentemente dalla sua validità. I punti e le croci rosse indicano l'inizio e la fine di un *gap* temporale, anche se è stato corretto.

In Figura 23, invece, si osserva un'interruzione nell'intervallo di euglicemia dovuta alla presenza di un *gap* temporale che supera la soglia consentita per effettuare correzioni.

4.3 Criteri per l'inclusione dei pazienti nell'analisi del segnale NIRS

La raccolta dei dati del segnale NIRS non sempre viene avviata in concomitanza con l'acquisizione dei dati CGM, poiché l'applicazione del sensore o della cuffia NIRS può essere posticipata di diverse ore per evitare eventuali disagi al neonato o a causa di altre richieste più urgenti per il personale sanitario, sono rari i casi in cui l'applicazione di entrambi avviene a

distanza di minuti. Spesso, la calibrazione del sensore CGM viene eseguita in un momento successivo causando ritardi nell'inizio dell'acquisizione dei dati relativi al segnale glicemico. Nel contesto dell'analisi condotta, è richiesto che i pazienti soddisfino determinati criteri affinché possano essere inclusi nello studio, in particolare, il periodo di acquisizione glicemica deve essere effettivamente coperto da registrazioni NIRS, ma più nello specifico parliamo del primo intervallo temporale euglicemico. Infatti, è fondamentale che il tracciato glicemico dei pazienti inizi con un periodo di stabilità glicemica. Questo criterio è necessario poiché lo studio è orientato alla valutazione delle possibili associazioni tra l'attività cerebrale neonatale, misurata il prima possibile al fine di evitare influenze derivanti dagli eventi glicemici e da fattori ambientali, e i risultati ottenuti dai test sullo sviluppo.

Il tempo comune tra l'acquisizione NIRS e il primo intervallo temporale con i livelli normali di glucosio nel sangue deve essere sufficientemente duraturo da consentire l'estrazione di almeno una finestra temporale di 5 minuti per la prosecuzione dell'analisi; per tanto, si procede con la sincronizzazione dei dati glicemici e dei dati NIRS. È importante notare che le frequenze di campionamento di questi dati sono differenti: i campionamenti dei dati glicemici avvengono ogni cinque minuti con una precisione nell'acquisizione che arriva fino al livello dei secondi, mentre i dati NIRS vengono campionati ogni 100 millisecondi. È stato ipotizzato per l'allineamento delle acquisizioni che i millisecondi nei campioni glicemici siano pari a 0 e l'errore risultante è trascurabile in quanto è considerato all'interno di una finestra temporale di 5 minuti, sulla quale si basano i risultati, contenente 3001 campioni. Per tanto, viene individuato l'esatto indice temporale di inizio e fine della finestra euglicemica all'interno dell'acquisizione NIRS, senza la necessità di effettuare un ricampionamento dei tracciati (vedi Figura 24).

```
PD1
-----
ANALYSIS OF EUGLYCAEMIA INTERVAL N1
The euglycemia window is within the NIRS acquisition
start at date 16.42.30 Tue 24 Mar 2020
First file to upload is the number 2
Index to start from is the number 7568
end at date 20.24.47 Tue 24 Mar 2020
Last file to upload is the number 36
Index to end up with is the number 24194
-----
```

Figura 24: Esempio di output della sincronizzazione dell'acquisizione NIRS e il primo intervallo euglicemico in questo caso riferita al PD1. Vengono riportate le date, i numeri dei file NIRS di inizio e fine euglicemia.

4.4 Analisi dei dati NIRS

L'analisi dei dati relativi all'emodinamica costituisce il fulcro centrale di questo studio e si conclude con l'estrazione delle matrici di connettività funzionale statica basate sui dati raccolti durante un periodo di acquisizione di 5 minuti. La decisione di adottare una finestra temporale di tale durata è stata presa in seguito a una valutazione ponderata basata su studi precedenti che hanno variato notevolmente la durata dei dati registrati considerati per l'analisi. Studi come quello di Bulgarelli et al.[120], che ha utilizzato 100 secondi di dati durante lo stato di riposo o come quello di Wang et al.[121] che ha teorizzato una durata di acquisizione minima tra i 2,5 e i 7 minuti, hanno portato ad adottare una soluzione nella media cercando di bilanciare vantaggi e svantaggi.

L'elaborazione dei dati viene eseguita attraverso l'uso del software MATLAB, sfruttando varie funzioni integrate per l'analisi dei segnali NIRS contenute nei pacchetti software *HOMER2*, *iso2mesh-master* e *NIRFASTER-master*.

4.4.1 Selezione della finestra temporale ottimale per l'analisi del segnale NIRS

La prima fase del processo comporta la selezione di un intervallo temporale ottimale di 5 minuti su cui saranno basate le matrici di connettività funzionale. Questa selezione è volta a garantire un'accurata rappresentazione dell'attività cerebrale nello stato di riposo, riducendo al minimo la presenza di disturbi o artefatti dovuti al movimento che possono essere presenti nei dati e massimizzando la copertura corticale.

La selezione dell'intervallo temporale ottimale si basa su tre criteri chiave:

1. Rapporto Segnale-Rumore (SNR): l'SNR deve superare il 90° percentile degli SNR calcolati su tutte le finestre possibili individuate per ciascun paziente, poiché l'obiettivo è garantire la qualità del segnale rispetto al livello di rumore presente nella rilevazione. Un elevato SNR indica un segnale con pochi disturbi, mentre un basso SNR suggerisce la presenza di rumori di fondo o contributi da segnali indesiderati.
2. Numero di Canali Non Rumorosi: questo criterio richiede che il numero di canali non rumorosi superi la mediana del numero di canali non rumorosi calcolati per ciascuna finestra

individuabile per paziente. Risulta cruciale massimizzare questa quantità in quanto l'aggiunta di ciascun canale informativo incrementa la precisione nella valutazione delle variazioni dei livelli di ossigeno nei tessuti nella zona specificamente monitorata, soprattutto in un approccio come quello proposto in questa tesi che punta a ricostruire le immagini corticali di emodinamica cerebrale.

3. Massima Copertura: il terzo criterio mira a garantire una copertura estesa della corteccia cerebrale riconoscendo che una maggiore copertura consente di prendere in considerazione una gamma più ampia di funzioni cerebrali, dato che le diverse regioni cerebrali sono associate a specifiche funzioni cognitive.

I file NIRS vengono campionati con una frequenza di 100 millisecondi e salvati periodicamente ogni 50 minuti. Questi file sono denominati in modo differente, ma contengono comunemente informazioni per l'identificazione del paziente, quali la data e l'ora di inizio dell'acquisizione; di conseguenza, i singoli file condividono la stessa data e ora se fanno parte della medesima acquisizione indipendentemente dai salvataggi effettuati ogni 50 minuti. L'ordine di acquisizione può essere identificato dalla presenza di una numerazione crescente nel titolo del file partendo da zero (assenza del numero) e aumentando progressivamente.

Questa informazione rivela una prima sfida nell'individuare la finestra temporale ottimale, infatti, non è garantito che l'intervallo di euglicemia sia completamente contenuto in una singola acquisizione di dati, in quanto a volte, i dati possono essere suddivisi in più slot che potrebbero determinare intervalli di tempo non coperti dall'acquisizione NIRS.

Il codice utilizzato per individuare la finestra temporale ottimale carica tutti i file appartenenti a una stessa acquisizione che rientrano nell'intervallo iniziale di euglicemia, inoltre, viene effettuato un controllo per determinare se l'acquisizione successiva, nel caso in cui rientrasse nello stesso intervallo euglicemico, sia una continuazione di quella precedente e in tal caso, anche i file relativi a quest'ultima vengono inclusi nel caricamento. Questi file vengono concatenati, il codice identifica l'indice esatto di inizio dell'intervallo di euglicemia per scartare i dati acquisiti precedentemente che potrebbero essere presenti e viene eseguita un'operazione simile per individuare l'indice finale dell'intervallo, se presente nell'acquisizione, scartando i dati successivi, senza la necessità di effettuare un ricampionamento dei tracciati, poiché, come detto in precedenza, si ipotizza che i millisecondi nelle acquisizioni CGM siano pari a 0.

Vengono quindi estratte tutte le finestre di 5 minuti esistenti nell'intervallo di euglicemia, con uno step temporale di spostamento della finestra di 1 minuto da una finestra all'altra e per ognuna di esse viene calcolato l'SNR, necessario per soddisfare il primo criterio, con la seguente formula:

$$SNR = mean\left(\frac{mean(D)}{std(D)}\right)$$

dove D è la matrice dei dati NIRS; questi valori vengono salvati in un vettore.

Nel caso in cui l'indice di fine non fosse compreso, il processo prosegue con la lettura dell'acquisizione successiva con tutti i file appartenenti a quest'ultima e all'intervallo di euglicemia; la procedura precedentemente descritta viene ripetuta e i nuovi valori vengono aggiunti al vettore creato in precedenza.

Al termine di questa estrazione dati viene calcolato il novantesimo percentile dei valori degli SNR (Figura 25).

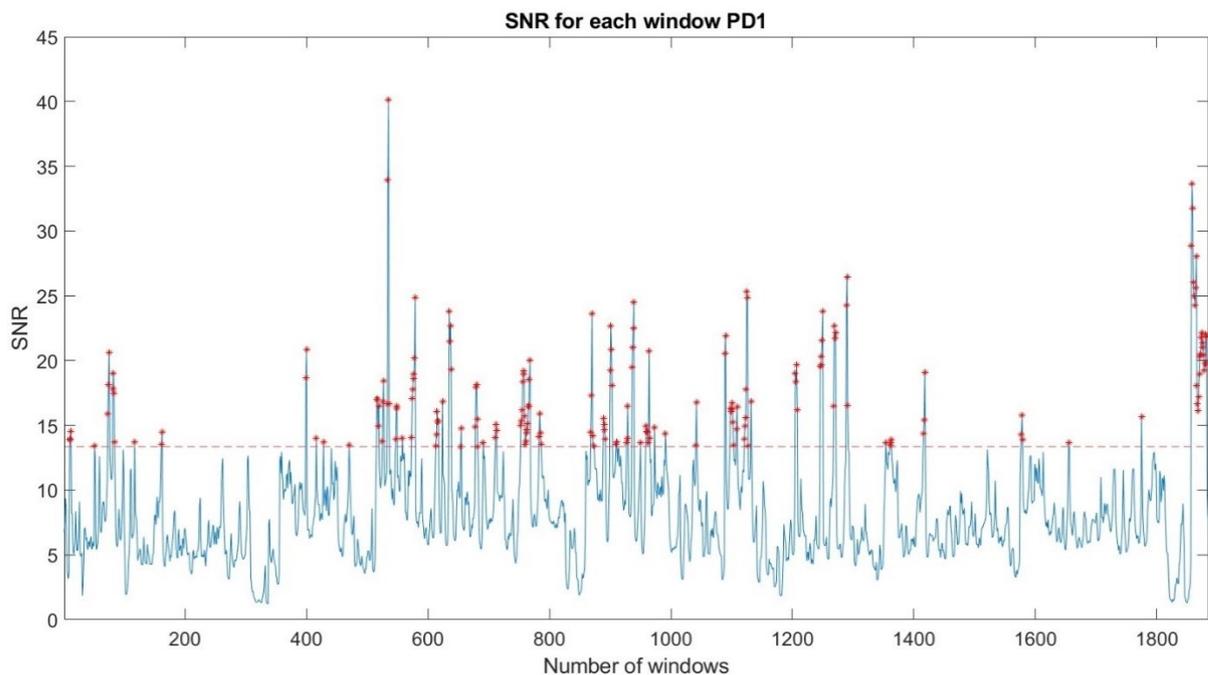


Figura 25: Valori di SNR per ogni singola finestra estratta dal primo periodo di euglicemia del paziente 1. Gli asterischi rossi indicano le finestre con un valore di SNR maggiore del 90esimo percentile, la linea rossa è posta all'altezza di questo valore.

A questo punto viene eseguito il ricaricamento dei file per il calcolo del secondo criterio aggiungendo una condizione aggiuntiva; infatti, per il calcolo della mediana dei canali buoni è necessario che la finestra su cui vengono calcolati i canali non rumorosi sia al di sopra del 90esimo percentile dell'SNR calcolato precedentemente. Tale metrica viene quindi applicata sul sotto insieme di finestre selezionate nel primo criterio.

Nell'ambito della NIRS la misurazione della luce da parte di un rilevatore è influenzata da vari fattori, tra cui lo spessore e il colore dei capelli, lo spessore del cranio e la distanza tra la sorgente di luce e il rilevatore stesso. Questi fattori devono essere presi in considerazione quando si valuta la capacità dei fotodiodi di convertire la luce in corrente elettrica, misurata sotto forma di tensione. Solitamente, c'è una relazione lineare tra la potenza della luce incidente e la tensione generata. Tuttavia, è importante sottolineare che questa relazione può diventare non lineare in condizioni particolari. Ad esempio, a basse potenze ottiche, quando ci si avvicina al rumore di fondo del sistema o al limite di saturazione, la relazione tra la potenza luminosa e la tensione generata può mostrare non linearità. In tali situazioni, se il numero di fotoni rilevati è uguale o inferiore al rumore di fondo del sistema, il canale di rilevamento non contribuisce con informazioni utili, ma introduce solo rumore nei dati; analogamente, quando il numero di fotoni si avvicina al limite di saturazione, il canale mostrerà un segnale piatto e non informativo (il rumore di fondo e il limite di saturazione dipendono dalle specifiche caratteristiche del sistema di acquisizione). Queste non linearità possono verificarsi quando la sorgente di luce e il rilevatore non sono perfettamente accoppiati, creando il fenomeno del "light piping", in cui la luce emessa dalla sorgente raggiunge direttamente il rilevatore senza attraversare il tessuto cerebrale, oppure quando sorgente e detettore sono troppo distanti o posti in zone dello scalpo più spesse o con più follicoli.

I canali possono essere esclusi dall'analisi, oltre che valutando l'intensità da loro misurata, anche a causa di un basso rapporto segnale-rumore (precedentemente è stato calcolato l'SNR medio considerando tutti i canali, ma ciò non garantisce che ciascun canale soddisfi la soglia di SNR necessaria per l'inclusione nell'analisi).

L'eliminazione dei canali rumorosi o poco informativi viene eseguita con la funzione da me implementata *removeNoisyChannels*, la quale porta all'eliminazione di un canale se al di sotto di una soglia (in questo caso posta a 2) sull'SNR e se con valori di intensità media fuori dal range settato, tra $5e-04$ e 3, per l'NTS. È sufficiente poi, che il canale venga eliminato per una delle due lunghezze d'onda perché sia escluso dall'analisi. La soglia SNR è stata fatta

leggermente variare a seconda del paziente a seguito di una valutazione qualitativa dei canali rimossi e conservati, per cercare di massimizzare il numero di canali buoni tenuti e, contemporaneamente, escludere i canali eccessivamente rumorosi. L'output è un vettore di booleani che assegna 1 ai canali mantenuti e 0 a quelli rimossi per tutti i 64 canali per ogni lunghezza d'onda.

Da un'ispezione visiva, sono stati notati nel dataset dei canali con andamento molto regolare e non fisiologico, contenenti dei segnali di disturbo probabilmente proveniente da altri macchinari che utilizzano la luce e usati in TIN o da problematiche con le sorgenti modulate in base alla loro trasformata di Fourier, per il multiplexing, usate dall'NTS. Questi canali, che presentano segnali con un andamento estremamente regolare non contenente informazioni rilevanti sull'emodinamica cerebrale, sono mantenuti dalla funzione precedente e la loro eliminazione richiederebbe un aumento della soglia SNR comportando al contempo la perdita di canali informativi. Per affrontare questa problematica viene introdotto un ulteriore criterio basato sul calcolo dello spettro di potenza del segnale, in particolare, si valutano specifici intervalli di frequenza che potrebbero contenere dei disturbi luminosi $[0.05 \div 2]$ Hz e $[3 \div 4]$ Hz e se viene rilevata una frequenza all'interno di tali intervalli con un valore di potenza superiore alla soglia $0.001 \frac{A^2}{Hz}$ in almeno una delle due lunghezze d'onda il canale corrispondente viene eliminato. Il criterio è applicabile perché è possibile discriminare tra il rumore e il segnale fisiologico considerando che la frequenza cardiaca nei neonati è situata nell'intervallo $[2 \div 3]$ Hz e che il contenuto in frequenza di interesse si trova al di sotto dei 0.5Hz.

I canali che soddisfano questi criteri vengono conteggiati e registrati in un vettore specifico per ciascuna finestra temporale (Figura 26); questo conteggio è utilizzato successivamente per calcolare la mediana del numero di canali mantenuti, il quale agisce come discriminante per il soddisfacimento del secondo criterio.

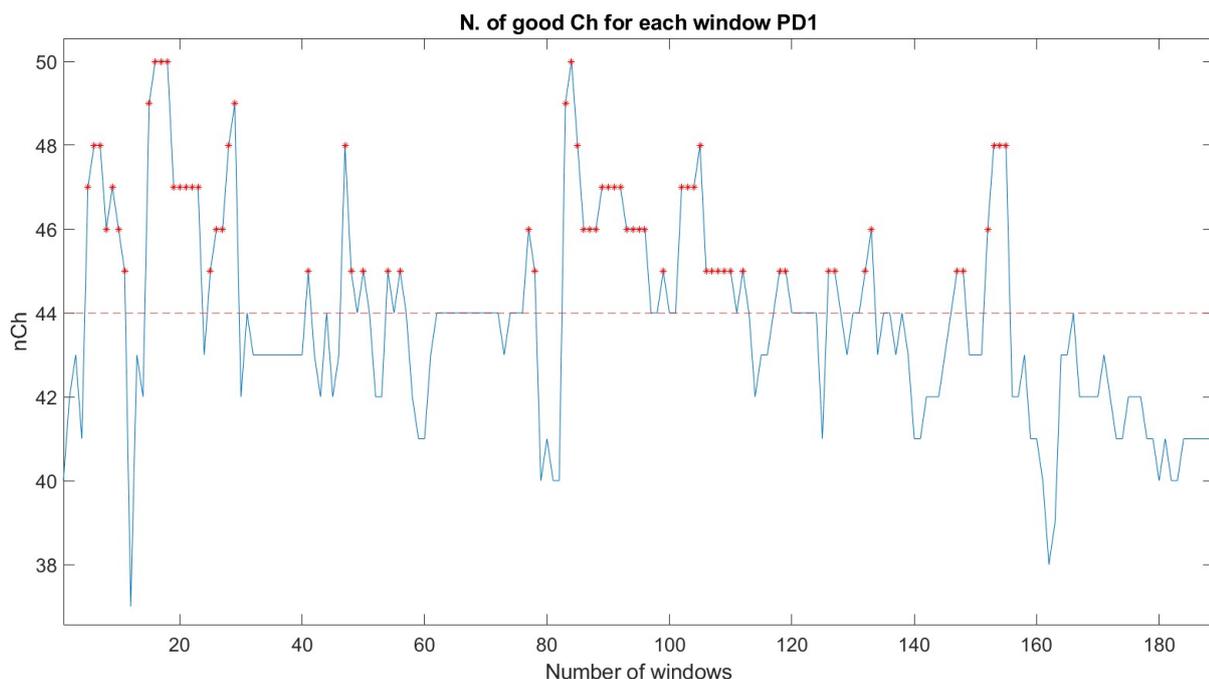


Figura 26: Numero di canali totale buoni per ogni finestra che soddisfa il criterio numero 1 estratta dal primo periodo di euglicemia del paziente 1. Gli asterischi rossi indicano le finestre con un numero di canali maggiore della mediana, la linea rossa è posta all'altezza di questo valore.

Il terzo criterio ha l'obiettivo di massimizzare la copertura cerebrale e viene realizzato attraverso il conteggio dei nodi "sensibili", ovvero quelli informativi in base all'array utilizzato, sul fondamento di una simulazione di propagazione della luce, ma limitando questa valutazione alle finestre in cui il numero di canali supera la mediana precedentemente calcolata e considerando solo i canali non eliminati.

Questa analisi viene condotta su una mesh volumetrica consona per ciascun paziente selezionata da un atlante che comprende modelli tridimensionali di teste neonatali relative a un intervallo di gestazione compreso tra la 29^a e la 44^a settimane [122] (vedi Figura 27); la scelta della mesh volumetrica è basata sulle settimane di gestazione del paziente con opportuni arrotondamenti e tiene conto anche del peso del neonato, il quale fornisce indicazioni sullo stadio effettivo di sviluppo (nei casi di neonati nati prima della 29esima settimana di gestazione, viene assegnato l'atlante più prossimo).

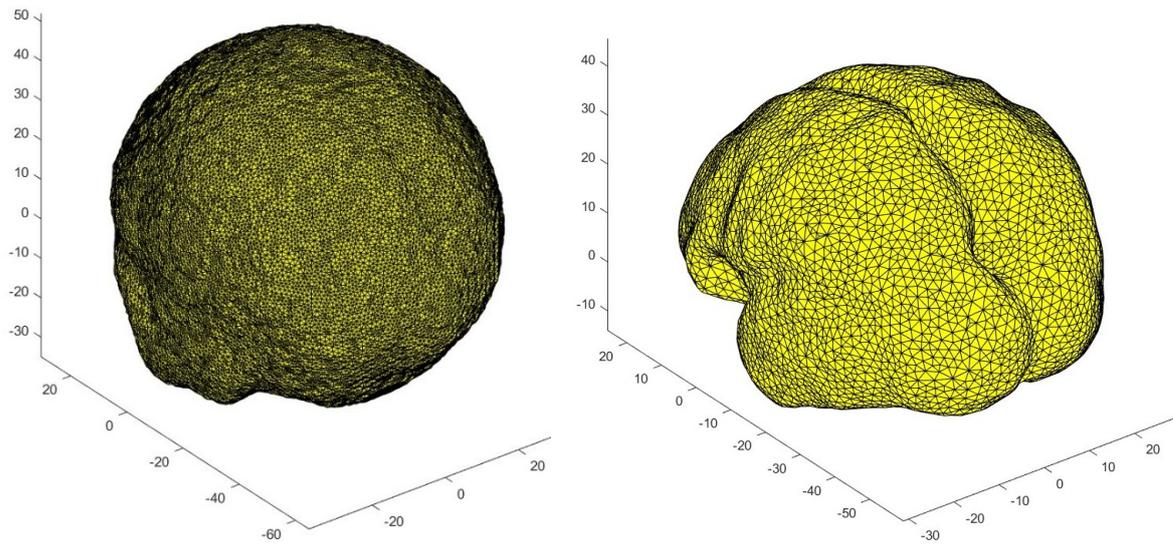


Figura 27: Esempio di modello di testa di 30 settimane di gestazione, a sinistra l'intero volume, a destra la corteccia cerebrale.

Per consentire l'individuazione dei nodi sensibili è necessario generare due mesh volumetriche per ciascuna lunghezza d'onda e per ciascun paziente, idonee all'utilizzo del pacchetto *NIRFASTer-master*. Queste mesh richiedono l'assegnazione di specifici coefficienti di assorbimento e diffusione a ciascun nodo della mesh dell'atlante in base al tessuto di cui fanno parte; questi coefficienti sono tratti dall'articolo di Uchitel et al.[3] (vedi Tabella 3). Inoltre, è essenziale determinare le posizioni delle sorgenti e dei rilevatori sulla superficie del modello considerando che le posizioni degli optodi si riferiscono al sistema internazionale 10-5 noto nell'elettroencefalografia (nel quale, gli elettrodi vengono posizionati a una distanza corrispondente al 10% o al 5% della distanza totale tra l'inion e il nasion o tra i due punti pre-auricolari lungo linee differenti) (Figura 28).

Tissue Type	Optical Properties					
	735 nm			850 nm		
	$\mu_a(mm^{-1})$	$\mu'_s(mm^{-1})$	N	$\mu_a(mm^{-1})$	$\mu'_s(mm^{-1})$	N
ECT	0.015	0.876	1.4	0.020	0.751	1.4
CSF	0.002	0.300	1.4	0.004	0.300	1.4
GM	0.018	0.860	1.4	0.019	0.673	1.4
WM	0.016	1.218	1.4	0.021	1.011	1.4

Tabella 3: "Tabella delle proprietà ottiche utilizzate in questo lavoro per ciascun tessuto. μ_a : coefficiente di

nodi appartenenti alla superficie, le aree degli elementi e la velocità della luce specifica per ciascun tessuto.

Una volta ottenute le mesh che descrivono la composizione dei tessuti cerebrali e la posizione degli optodi sullo scalpo, si procede a risolvere il *forward problem*, ovvero un processo che simula la propagazione della luce attraverso il tessuto cerebrale e restituisce una matrice di sensibilità nota come Jacobiano (Figura 29). Le regioni corticali con valori più elevati all'interno dello Jacobiano rappresentano quelle che contribuiscono in modo predominante ai segnali rilevati sulla superficie dello scalpo, ovvero quelle più sensibili al rilevamento delle variazioni dei coefficienti di assorbimento; inoltre la dimensionalità della matrice è pari al numero di nodi per ciascun canale ed è calcolata separatamente per ciascuna delle lunghezze d'onda considerate.

La simulazione della propagazione della luce è eseguita mediante il metodo degli elementi finiti utilizzando la funzione *jacobian_FD* inclusa nel pacchetto software *NIRFASTer-master*. È importante notare che in questa simulazione la frequenza di modulazione delle sorgenti luminose è impostata a 0 Hz poiché queste fonti emettono luce in modo continuo senza pulsazioni.

La determinazione del contributo complessivo di ciascun nodo al segnale avviene tramite la somma dei contributi provenienti esclusivamente dai canali non rimossi, quindi calcolando la matrice di sensibilità totale escludendo dalla somma i canali eliminati (Figura 30).

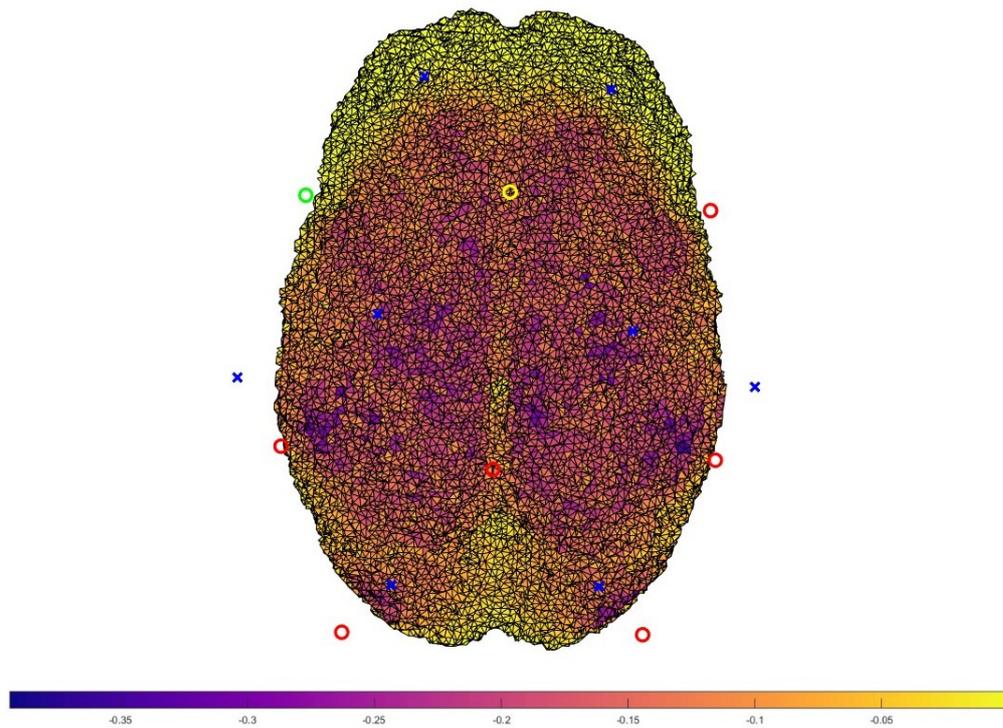


Figura 29: Rappresentazione della matrice di sensibilità sulla corteccia cerebrale in un atlante riferito alle 30 settimane di gestazione considerando il contributo di tutti i canali. Vengono riportate con i cerchi le sorgenti e le croci i rilevatori a livello della superficie dello scalpo. I colori più scuri indicano una maggior sensibilità.

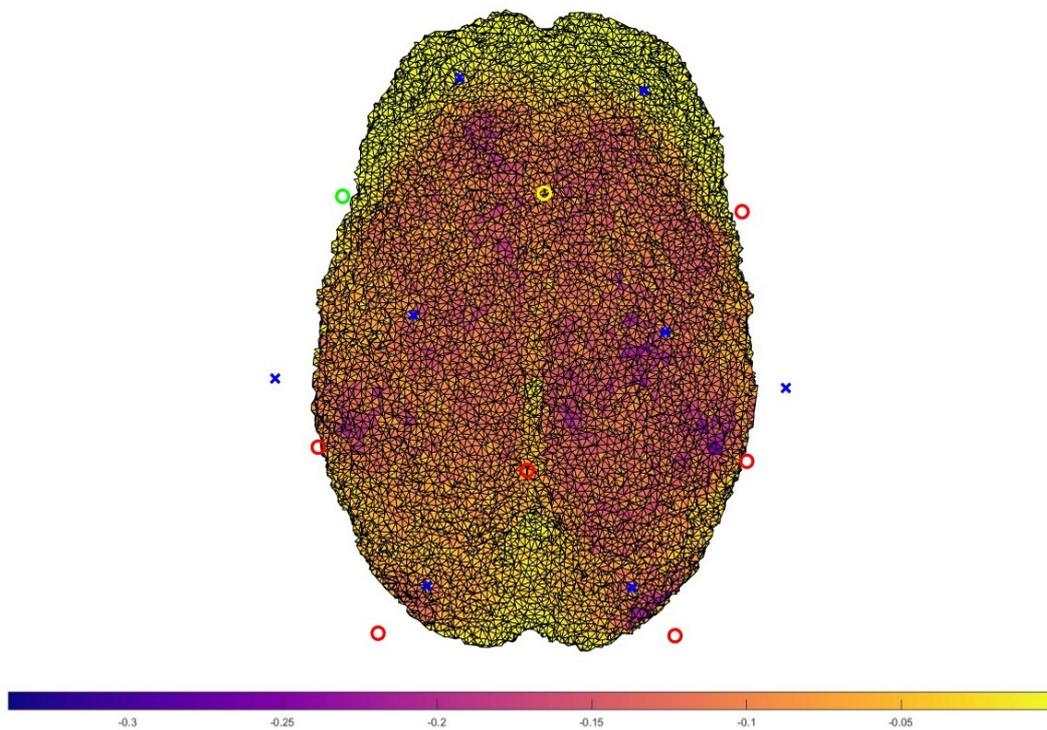


Figura 30: Esempio di matrice di sensibilità sulla corteccia cerebrale in un atlante riferito alle 30 settimane di gestazione considerando il contributo di tutti i canali buoni in una finestra temporale per PD1. Vengono riportate

con i cerchi le sorgenti e le croci i rilevatori a livello della superficie dello scalpo. I colori più scuri indicano una maggior sensibilità.

Un nodo è considerato “coperto” quando una variazione prevista del coefficiente di assorbimento del 10%, durante una risposta emodinamica in un blocco di tessuto di 1 cm^3 , produce un cambiamento nell'intensità del segnale fNIRS misurato superiore all'1% (criterio definito da Brigadoi et al. [124]). In modo specifico, viene determinato il valore di soglia al di sopra del quale un nodo viene classificato come sensibile basandosi sui valori di sensibilità presenti nella matrice Jacobiana relativa alla lunghezza d'onda di 850 nm; la selezione della matrice Jacobiana da utilizzare tra le due lunghezze d'onda disponibili è effettuata casualmente, poiché tale scelta non influirebbe sui risultati finali. La finestra temporale ottimale è selezionata in base al massimo numero di nodi attivi contenuti al suo interno e in caso di parità tra più finestre si privilegia la finestra temporale che precede cronologicamente le altre (Figura 31).

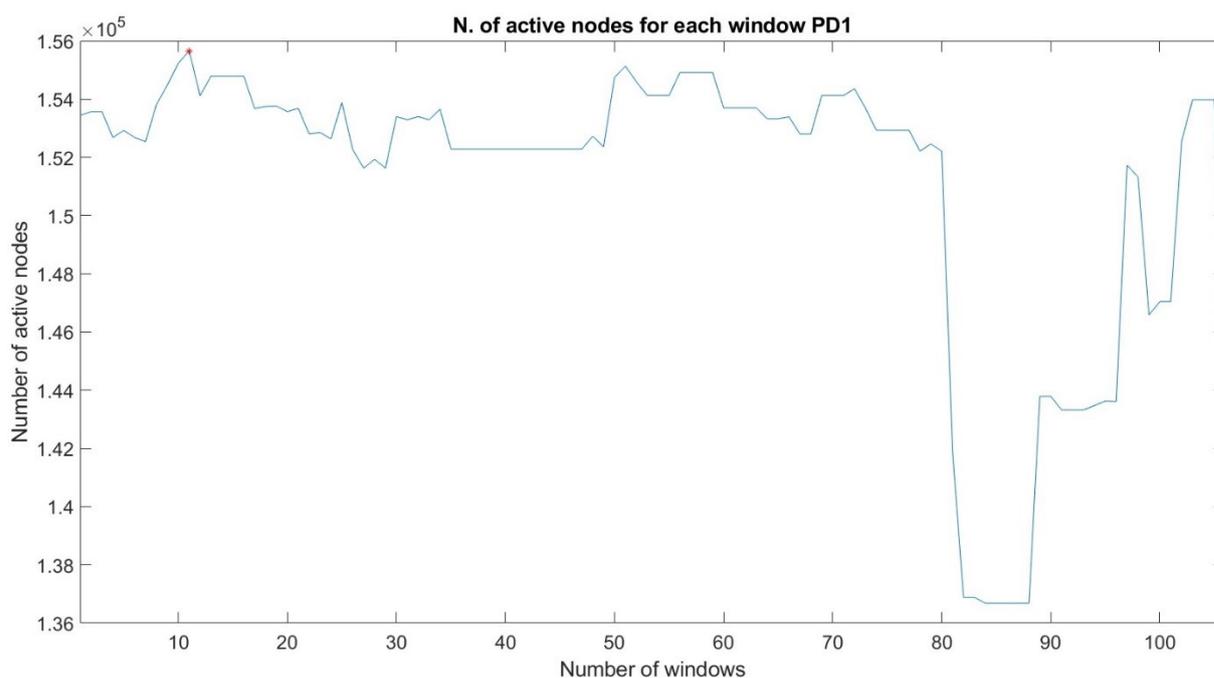


Figura 31: Numero di nodi sensibili per ogni finestra che soddisfa il criterio numero 1 e 2 estratta dal primo periodo di euglicemia di PD1. L'asterisco rosso indica la finestra ottimale.

In Figura 32 è riportato un esempio di output relativo alla miglior finestra estratta per il paziente PD1.

```
PD1
BEST 5-MINUTE WINDOW is found in
25-Mar-2020 02:30:47
25-Mar-2020 02:35:47
File name: PD1\PD1 BC bis 20.24.47 Tue 24 Mar 2020 7.nirs
Start index: 9594
End index: 12594
Window characteristics
SNR: 14.0037
Number of good channels: 46
Number of active nodes: 154054
```

Figura 32: Esempio di output della finestra ottimale con tutte le specifiche. (Riferito a PD1).

4.4.2 Pipeline di elaborazione del segnale NIRS

Dopo aver identificato la finestra ottimale di 5 minuti per l'analisi dell'attività cerebrale in stato di riposo è essenziale procedere con l'elaborazione dei segnali al fine di ridurre al minimo il contributo del rumore preservando al contempo le informazioni significative.

L'individuazione dei canali informativi è stata già completata durante la selezione della miglior finestra, pertanto questa fase, comunemente inclusa nel processo di elaborazione del segnale, è stata precedentemente eseguita.

Successivamente, i segnali vengono convertiti da intensità a densità ottiche attraverso l'utilizzo della seguente formula logaritmica:

$$OD = -\ln\left(\frac{I_2}{I_1}\right)$$

Questa trasformazione normalizza le intensità I_2 rispetto alla loro media nel tempo (I_1), di conseguenza, il segnale risultante ha una media nulla e una varianza normalizzata semplificando così il successivo processo di elaborazione del segnale in quanto tutte le intensità presentano una *baseline* univoca.

A questo punto, viene eseguito il rilevamento degli artefatti da movimento all'interno dei segnali. Tali artefatti possono verificarsi a causa di spostamenti relativi nell'accoppiamento tra gli optodi e lo scalpo, ad esempio durante il movimento delle sopracciglia o degli arti; nei neonati in particolare possono anche essere correlati alle procedure mediche di routine o alle visite dei genitori che muovendo il bambino spostano la cuffia. Questi artefatti possono manifestarsi come variazioni ad alta frequenza nei dati, che sono più facili da individuare e correggere; tuttavia, possono anche causare cambiamenti più lenti che sono difficili da distinguere dai cambiamenti fisiologici e di conseguenza, da correggere. Per affrontare questo problema, vengono impiegate tecniche di elaborazione dei segnali basate sui cambiamenti nell'ampiezza e nella frequenza del segnale al fine di individuare ed eliminare gli artefatti da movimento. Le prestazioni di queste tecniche variano in base al tipo specifico di artefatto da movimento, ad esempio, l'interpolazione spline [125], è efficace nella correzione di artefatti chiaramente identificabili nei segnali misurati, come i picchi, mentre il filtraggio wavelet risulta più adatto per correggere i movimenti più sottili, ma può sottostimare l'ampiezza delle risposte emodinamiche e la target recursive PCA [126] dimostra maggiore efficienza quando gli artefatti da movimento sono presenti sincronicamente in tutti i canali. Per l'analisi dei segnali NIRS a disposizione è stato applicato il filtraggio wavelet [127], il quale, dopo una serie di prove condotte con differenti metodi, è emerso come il più efficace per la gestione degli artefatti da movimento presenti in queste acquisizioni e può essere generalizzato per tutti i pazienti garantendo comunque risultati di buona qualità, ovvero senza eccessivi bias. Tra i metodi precedentemente valutati, è stato preso in considerazione anche il metodo proposto da Yang et al. [128], uno dei più recenti nel campo (2022) sviluppato appositamente per i dati fNIRS neonatali; tuttavia, la prestazione di questa tecnica sui dati a disposizione non ha dato gli esiti sperati, introducendo bias o non riuscendo a identificare correttamente tutti gli artefatti da movimento.

L'approccio conosciuto come filtraggio wavelet, originariamente proposto da Molavi e Dumont [127], costituisce un metodo per la correzione delle interferenze causate dal movimento rilevate nei singoli canali di acquisizione. Tale approccio si basa sulla decomposizione del segnale NIRS proveniente da ciascun canale tramite la trasformata wavelet discreta che divide il segnale in due parti, una associata alle frequenze elevate (coefficienti dei dettagli) e l'altra alle frequenze basse (coefficienti di approssimazione) con l'assunzione chiave che i coefficienti wavelet dei dettagli seguano una distribuzione gaussiana (vedi Figura 33).

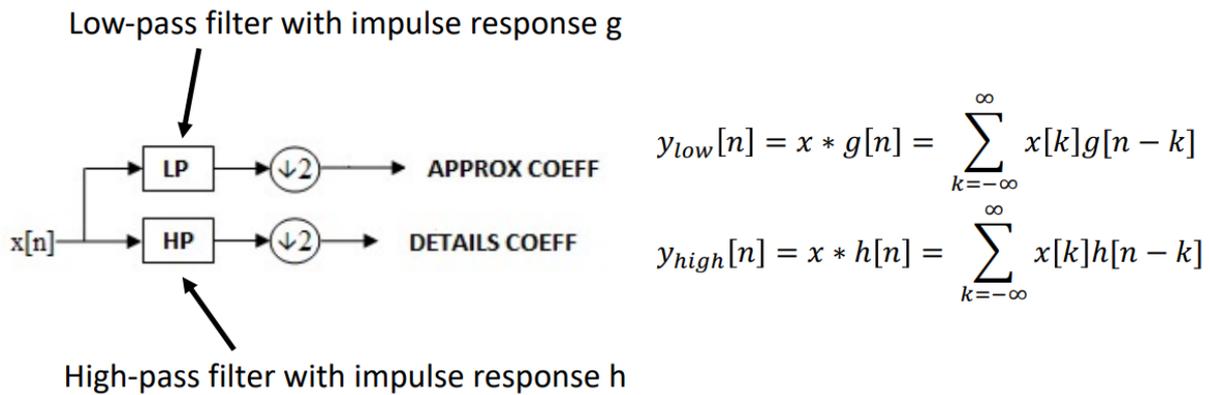


Figura 33: Schema dell'approccio wavelet. Preso dalle slides del corso Imaging for Neuroscience della Professoressa Brigadoi.

Poiché gli artefatti derivati dal movimento sono legati a segnali ad alta frequenza e dotati di una maggiore mutevolezza rispetto alla componente emodinamica, caratterizzata da un'evoluzione più lenta e una minore variabilità, è possibile discriminarli nelle code della distribuzione dei coefficienti dei dettagli. Questi coefficienti vengono identificati come *outlier* se superano un determinato numero di volte l'intervallo interquartile della distribuzione dei coefficienti wavelet, poiché è altamente probabile siano dovuti a un artefatto da movimento; la soglia viene assegnata a seconda delle caratteristiche del segnale. Successivamente all'azzeramento dei coefficienti precedentemente identificati è possibile procedere con la ricostruzione del segnale tramite la trasformata wavelet inversa, risultando in una versione del segnale originale in cui gli artefatti sono notevolmente attenuati o completamente rimossi.

Questo approccio presenta diversi vantaggi tra i quali: il mantenimento delle informazioni in frequenza del segnale originale, la futilità di una pre-identificazione degli artefatti (poiché l'esecuzione dell'individuazione e della correzione avviene in un singolo passaggio) e la capacità di lavorare sul singolo canale. Tuttavia, vi sono alcune limitazioni: la lentezza computazionale, specialmente quando applicata a un ampio numero di pazienti richiede notevoli risorse di calcolo e tempo; la soglia utilizzata per discriminare gli outlier è applicata in modo uniforme a tutti i pazienti richiedendo una soppesata considerazione per determinare la scelta ottimale e va scelta soggettivamente. È importante notare che il filtraggio wavelet potrebbe sottostimare l'ampiezza della risposta emodinamica e potrebbe avere difficoltà nella

correzione dei cambiamenti di *baseline*, tuttavia, è stato osservato che nei segnali analizzati finora la presenza di cambiamenti significativi nella linea di base del segnale dovuti agli artefatti da movimento è limitata (vedi Figura 34).

Questo metodo è implementato nel pacchetto *HOMER2* che mette a disposizione una funzione denominata *hmrMotionCorrectWavelet*, nella quale l'unico parametro configurabile dall'utente è noto come *iqr*, il quale funge da soglia per l'identificazione degli *outliers* e in questo contesto è stato fissato a 1.2.

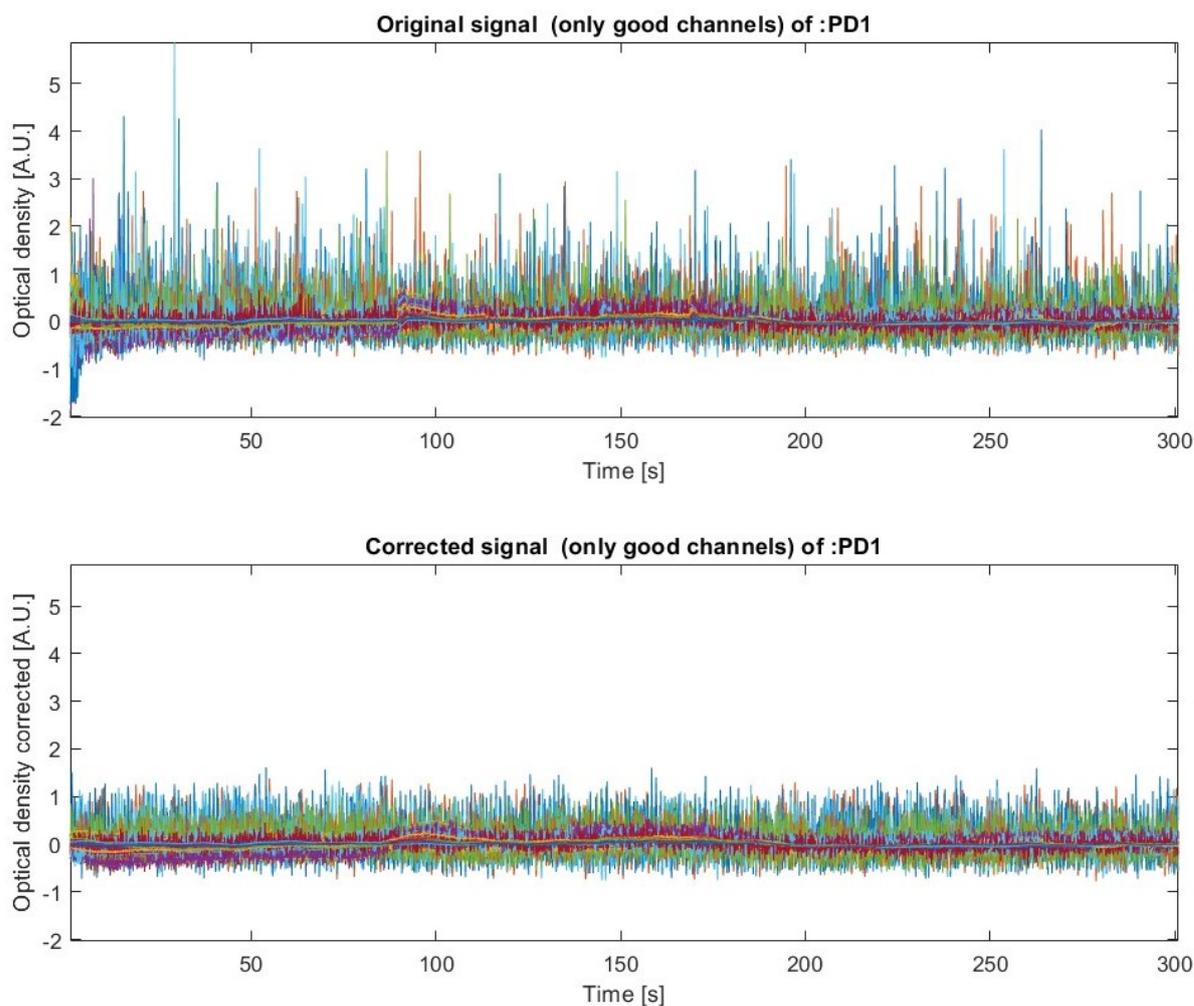


Figura 34: Confronto tra il segnale in intensità ottica originale e il segnale dopo la correzione degli artefatti mediante il filtro wavelet per entrambe le lunghezze d'onda (PD1).

In seguito, tramite l'utilizzo della funzione *hmrBandpassFilt*, viene eseguita la rimozione di parte del rumore fisiologico presente nel segnale (come l'attività cardiaca e la respirazione) e

del rumore alle alte frequenze. È importante notare che l'interferenza fisiologica proviene sia dall'attività cerebrale che dagli strati tessutali esterni al cervello come la pelle, il cranio e le meningi, che sono altamente vascolarizzati e quando la luce viaggia dalla sorgente al rivelatore essa deve attraversare due volte questi strati superficiali, di conseguenza, le misure ottiche risultano essere significativamente influenzate dalla loro attività vascolare. Tuttavia, nel neonato, dato che lo spessore dello scalpo e del cranio è molto sottile, l'influenza è minima, anche perché la sensibilità dei canali NIRS all'attività cerebrale è molto più alta rispetto all'adulto [32].

Questa rimozione avviene applicando un filtro passa-banda con frequenze di taglio pari a 0.009 e 0.08 Hz particolarmente adatto per lo studio dello stato di riposo (resting-state) (Figura 35).

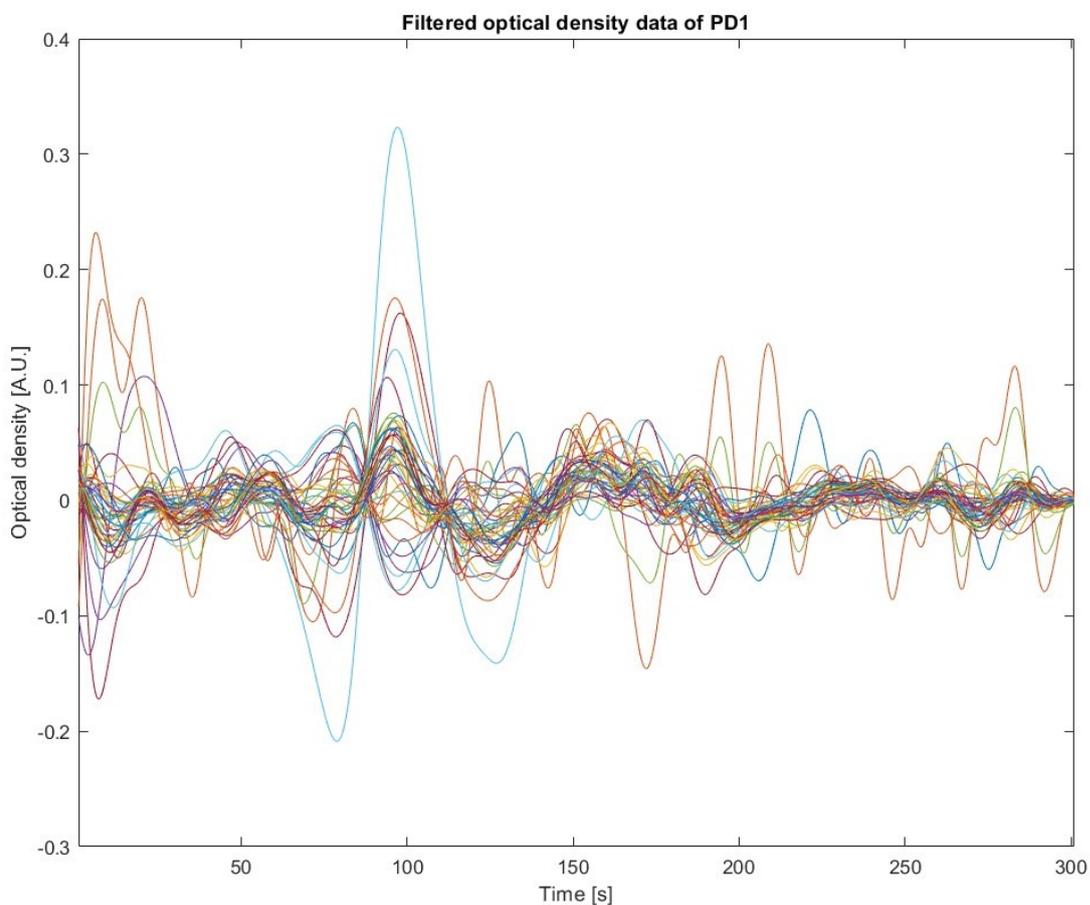


Figura 35: Segnale in intensità filtrato per entrambe le lunghezze d'onda (PD1).

4.4.3 Ricostruzione delle immagini e selezione delle regioni di interesse

L'obiettivo principale di questo paragrafo consiste nella generazione di matrici che consentano di illustrare le variazioni dell'emoglobina sia ossigenata che deossigenata sulla superficie della corteccia cerebrale nel corso del tempo. Tali variazioni vengono calcolate per ciascun punto (nodo) presente nella mesh volumetrica, precedentemente creata in base alle caratteristiche tessutali specifiche del neonato, e per ogni istante della finestra di temporale. Come indicato nel paragrafo 4.4.1, l'atlante utilizzato per le ricostruzioni è un atlante neonatale [122] che fornisce, per ogni settimana di gestazione dalla 29esima alla 44esima, un modello tridimensionale di testa neonatale, suddiviso nei seguenti tessuti: tessuto extra-cerebrale, fluido cerebrospinale, materia grigia, materia bianca, cervelletto e tronco encefalico; delle mesh di superficie della materia grigia e dello scalpo e le posizioni dei punti 10-5 del sistema internazionale EEG.

Poiché il problema diretto (*forward problem*) è stato previamente risolto e gli Jacobiani sono stati calcolati (uno per ogni lunghezza d'onda), dove ciascuna riga rappresenta la sensibilità del canale nel misurare variazioni nel coefficiente di assorbimento dei tessuti attraversati, la risoluzione del problema inverso può essere affrontata per ottenere l'obiettivo desiderato. Questa soluzione impiega un approccio che consente la ricostruzione delle variazioni di emoglobina ossigenata (HbO) ed emoglobina deossigenata (HbR) a partire dalle variazioni della densità ottica utilizzando la formulazione modificata della legge di Beer-Lambert:

$$\Delta\mu_{a|\lambda i} = \tilde{\mu}_{HbO|\lambda i}\Delta C_{HbO} + \tilde{\mu}_{HbR|\lambda i}\Delta C_{HbR} + \tilde{\mu}_{H_2O|\lambda i}\Delta C_{H_2O} + \tilde{\mu}_{Melanin|\lambda i}\Delta C_{Melanin} + \dots$$

Questo metodo esclude i contributi provenienti dai componenti di altri tessuti (acqua, melanina, lipidi) poiché risultano trascurabili o possono essere ragionevolmente considerati costanti durante il periodo di osservazione di cinque minuti. La formula utilizzata è la seguente:

$$\Delta OD_{\lambda i} = J \Delta\mu_{a|\lambda i}$$

dove ΔOD rappresenta la matrice delle variazioni nella densità ottica per ogni canale nel tempo, J è la matrice di sensitività del paziente, dalla quale sono state rimosse le righe corrispondenti ai canali eliminati durante la fase di preelaborazione, $\Delta\mu_{a|\lambda i}$ è la variazione dei coefficienti di

assorbimento nel tempo che varia per le due lunghezze d'onda considerate. In questo caso il problema inverso è stato linearizzato e per stimare i cambiamenti in HbO e HbR, per tanto è necessario invertire la matrice Jacobiana tramite l'equazione:

$$\Delta\mu_{a|\lambda i} = J^{-1}\Delta OD_{\lambda i}$$

Tuttavia, l'inversione della matrice Jacobiana presenta diverse sfide poiché la matrice J non è quadrata, rendendo il problema: sotto-determinato in quanto il numero di nodi (incognite) supera il numero di canali (dati) disponibili, senza la presenza di una soluzione univoca, malposto e malcondizionato, poiché durante il processo di inversione si amplifica il rumore nei dati, il che può complicare ulteriormente la stima precisa dei cambiamenti nelle concentrazioni di HbO e HbR.

L'approccio per superare tali problematiche consiste nell'applicare una tecnica di regolarizzazione alla soluzione del problema inverso; in questo contesto, viene impiegata la regolarizzazione di Tikhonov di ordine zero, la quale mira a evitare l'amplificazione del rumore durante l'inversione della matrice Jacobiana. Questo processo si realizza mediante la seguente formula:

$$J^{-1} \approx J^T (JJ^T + \lambda I)^{-1}$$

$$\text{con } \lambda = \lambda 1 \max(S) \text{ e } S = \text{svd}(JJ^T)$$

dove λ rappresenta il parametro di regolarizzazione che va a smussare la soluzione riducendo l'errore associato all'amplificazione del rumore. Il parametro $\lambda 1$ è stato qui fissato a 0.1.

La metodologia adottata consente di stimare con affidabilità le variazioni nelle concentrazioni di emoglobina ossigenata (ΔC_{HbO}) e deossigenata (ΔC_{HbR}) per ciascun nodo nella mesh volumetrica a ogni istante temporale della finestra di euglicemia selezionata (ogni 100ms). Poiché la NIRS rileva segnali affidabili solamente a livello corticale, abbiamo mappato le soluzioni ottenute nella mesh volumetrica sulla corteccia cerebrale assegnando ad ogni nodo della mesh corticale la media dei valori dei nodi della mesh volumetrica circostanti all'interno di un raggio di 5mm. È importante sottolineare che questa approssimazione non comporta

alcuna perdita di informazione significativa, dal momento che questa selezione dei dati risulta confacente con la sensibilità strumentale.

La visualizzazione delle immagini, sebbene non sia un requisito fondamentale per gli obiettivi dello studio, è stata comunque condotta al fine di esaminare i risultati intermedi e convalidare l'efficacia del metodo impiegato. In Figura 36 sono presentate le immagini relative a PD1 ed è possibile osservare che in aree caratterizzate da significativi aumenti nelle variazioni della concentrazione di deossiemoglobina, si riscontrano contemporaneamente diminuzioni nei livelli di emoglobina ossigenata, come ci si aspetterebbe per il principio dell'accoppiamento neurovascolare. Questa osservazione supporta la corretta implementazione del procedimento di analisi utilizzato nello studio.

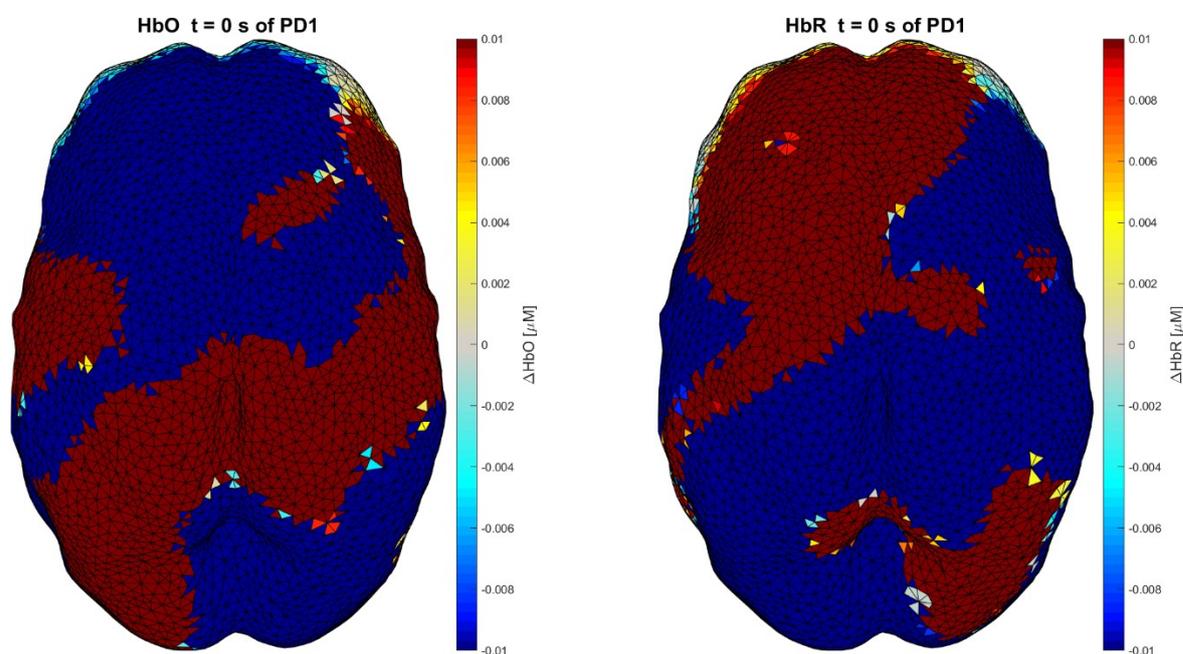


Figura 36: Rappresentazione della corteccia cerebrale di un neonato di 30 settimane di gestazione, riferita a PD1. A sinistra sono mostrate le variazioni di emoglobina ossigenata (HbO), mentre a destra sono rappresentate le variazioni di emoglobina deossigenata (HbR). Le concentrazioni sono espresse in μM al tempo 0s rispetto ai 5 minuti della finestra temporale considerata.

Per raggiungere l'obiettivo finale dello studio, ovvero valutare se esiste una relazione tra la connettività cerebrale del neonato a riposo alla nascita e i risultati dei test sullo sviluppo, è necessario affrontare il problema della molteplicità statistica, in primis nel calcolo della

connettività. Correlare tutti i nodi della corteccia cerebrale tra di loro potrebbe generare un elevato numero di comparazioni multiple, aumentando il rischio di ottenere risultati erranei (falsi positivi). Perciò, per mitigare questa problematica, si è adottato un approccio che comporta la creazione di Regioni di Interesse (ROI) e la loro correlazione.

La creazione delle ROI è vantaggiosa, poiché, sono riferite a particolari aree encefaliche che riflettono funzioni cerebrali differenti, permettendo, in questo modo, di mitigare il problema della molteplicità statistica e al contempo di selezionare determinate zone del cervello in base ai criteri dell'analisi.

Le ROI vengono individuate sulla base della posizione dei punti di riferimento del sistema 10-20 proiettati sulla corteccia cerebrale. La selezione delle posizioni dei punti di riferimento è limitata ai nodi sensibili, al fine di creare regioni con una maggiore probabilità di includere un'area circostante coperta dall'array di misurazione; in questo contesto, la valutazione della sensibilità di ciascun nodo viene effettuata considerando il suo contributo alla sensibilità totale dell'array derivante da tutti i canali plausibili (a prescindere da quelli eliminati), garantendo così un'identificazione univoca delle ROI coerente con il modello di testa utilizzato e indipendente dal paziente. Nel dettaglio, per questo processo, si utilizza la matrice di sensibilità relativa alla lunghezza d'onda di 850 nm (la scelta tra le due matrici di sensibilità è arbitraria) e la soglia viene calcolata come nel capitolo 4.4.1 per il terzo criterio di selezione della finestra ottimale.

L'assegnazione di ciascun nodo a una specifica ROI avviene se il nodo si trova a una distanza inferiore a 1.5 cm dal centro della ROI ed è univoca, ovvero, ogni nodo può appartenere esclusivamente a una singola ROI; in situazioni di sovrapposizione le ROI laterali hanno la precedenza rispetto a quelle centrali (Figura 37).

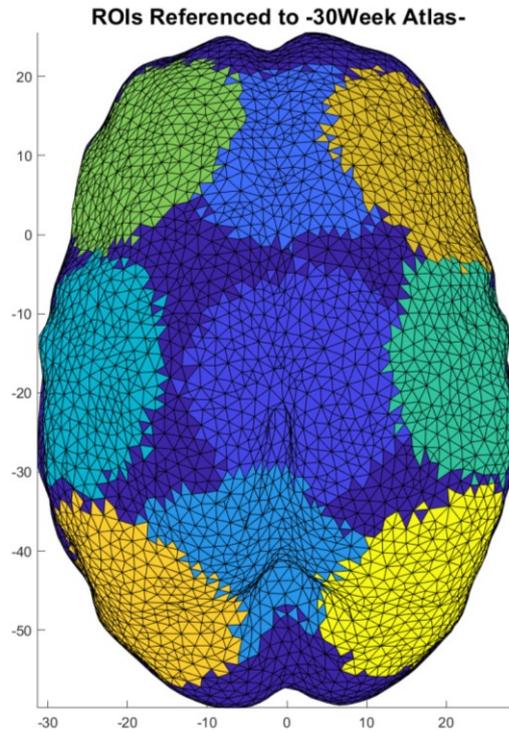


Figura 37: Rappresentazione delle ROI con colori differenti sulla corteccia cerebrale dell'atlante riferito alle 30 settimane di gestazione.

Con l'aumento delle settimane di gestazione diventa necessario utilizzare modelli di testa più adeguati per i neonati e questo si traduce in un aumento della dimensionalità del modello, con un conseguente incremento del numero complessivo di nodi in generale, in particolare dei nodi sensibili. Di conseguenza, nelle settimane di gestazione più avanzate vengono individuate un maggior numero di ROI, tuttavia, per garantire confronti coerenti tra i modelli vengono selezionate e mantenute solo le ROI che sono identificabili in tutti i modelli usati, per un totale di 9 ROI (come evidenziato nella Figura 37). Nel dettaglio le aree cerebrali coperte comprendono le regioni frontali, centrali e parietali sia di destra che centrali e di sinistra, corrispondenti ai punti di riferimento C1, Cz, C3, P1, Pz, P3, F1, Fz, F3, permettendo principalmente l'analisi della corteccia premotoria, motoria primaria e somatosensoriale.

4.4.4 Estrazione delle matrici di connettività funzionale

Per ottenere le matrici di connettività funzionale, si calcola il segnale medio per ciascuna delle ROI durante la finestra temporale considerata; questo calcolo implica la media delle variazioni di concentrazione di emoglobina ossigenata e deossiemoglobina tra i nodi presenti all'interno delle ROI. I segnali medi sono considerati validi solo se il numero di nodi sensibili, basato sul contributo dei canali buoni tenuti per ciascun paziente, supera il 33% dei nodi nell'area di interesse. In caso contrario, il segnale viene sostituito da uno indefinito e il coefficiente risultante dalle correlazioni con tale segnale viene considerato non valido. Questo criterio è stato introdotto per garantire confronti coerenti tra i segnali mediati; includendo un numero adeguato di nodi sensibili che contribuiscono in modo significativo al segnale registrato nella regione, possiamo supporre che la copertura della regione da parte dell'array contenente solo i canali buoni, fosse sufficiente.

Le matrici di connettività funzionale sono calcolate tramite correlazione di Pearson tra le serie temporali medie estratte, una per HbO e una per HbR, di due ROI. Questa misura di associazione è appropriata poiché soddisfa le condizioni necessarie per l'applicazione: le variabili coinvolte seguono una distribuzione normale o approssimativamente normale, non vi sono *outlier* significativi che potrebbero influenzare il risultato (grazie alla mediazione del segnale su più nodi) e le misurazioni sono comparabili poiché riferite a una stessa *baseline*.

Le matrici risultanti sono simmetriche in quanto la correlazione tra due variabili (nel nostro caso i segnali medi per ciascuna ROI) è la stessa se le variabili stesse vengono scambiate ed inoltre, sulla diagonale tutti i valori di correlazione sono pari a 1, indicando una perfetta correlazione del segnale con se stesso.

Successivamente, viene applicata la correzione di Bonferroni per ridurre il rischio di errore di tipo I, il che comporta una diminuzione del livello di significatività α (originariamente fissato a 0.5) in base al numero totale di confronti effettuati, considerando che questa correzione è molto conservativa e può aumentare il rischio di errori di tipo II quando si effettuano numerosi confronti.

In aggiunta, viene generata una matrice di connettività funzionale standardizzata Z applicando la trasformazione Z di Fisher ai coefficienti di correlazione, garantendo così la comparabilità tra i coefficienti.

In conclusione, tutti i pazienti presentano coefficienti di connettività funzionale validi, tranne il paziente 14 il cui segnale nelle ROI frontali, Fz e F3, non soddisfa il criterio di numerosità dei nodi sensibili e di conseguenza, presenta confronti indeterminati con tali ROI in entrambe le matrici di connettività funzionale.

4.5 Metodi di calcolo degli indici del neurosviluppo

I test al computer somministrati a 12 e 24 mesi di età corretta vengono registrati tramite una videocamera che consente la visualizzazione degli occhi del bambino e dello schermo, ed utilizzando il software *VirtualDub* i video vengono suddivisi in fotogrammi catturati ogni 40ms, permettendo la decodifica dei movimenti oculari e la registrazione dei tempi saccadici e di fissazione in una tabella.

Nel caso del test *Gap-Overlap*, vengono registrati in una tabella Excel diversi parametri per ciascuna prova (Figura 38), tra cui la tipologia (se “Gap” o “Overlap”), la posizione dello stimolo (se a destra o sinistra rispetto al centro dello schermo), la direzione dello spostamento della saccade (se a destra o sinistra; a partire dal centro, dove prima di ogni trial viene mostrato uno stimolo per attrarre l’attenzione del bambino), la latenza saccadica (ovvero il tempo impiegato dal bambino per iniziare il movimento oculare verso il nuovo oggetto comparso) e un valore pari a 1 se lo sguardo si dirige verso lo stimolo, oppure pari a 0 in caso contrario. Le prove in cui il bambino non guarda lo stimolo iniziale o in cui il movimento oculare ha una durata inferiore a 80ms o superiore a 1000ms vengono escluse dall’analisi; inoltre, affinché il test sia considerato statisticamente affidabile, sono necessari almeno 7 trial validi per ciascuna condizione [129].

					ACCURACY	LATENCY	NOTE
TRIAL 7	TARGET ON	POSITION	SACCADE ON	POSITION			
GAP	169760	R	170080	R	1	320	
TRIAL 8	TARGET ON	POSITION	SACCADE ON	POSITION			
OVERLAP	174440	R			NON VALIDO		Non guarda il cue centrale
TRIAL 9	TARGET ON	POSITION	SACCADE ON	POSITION			
OVERLAP	180520	R	181080	R	1	560	
TRIAL 10	TARGET ON	POSITION	SACCADE ON	POSITION			
GAP	185200	R			NON VALIDO		Non guarda il cue centrale

Figura 38: Esempio di tabella di decodifica per il calcolo delle metriche del test Gap-Overlap. Viene riportata la tipologia del trial, il tempo espresso in ms di apparizione dello stimolo target e la sua posizione sullo schermo. Il tempo a cui corrisponde l'inizio del movimento oculare del bambino e la direzione di tale movimento e la latenza dello sguardo, ovvero il tempo richiesto per far partire la saccade. Il numero dell'accuratezza indica se il bambino ha spostato lo sguardo verso lo stimolo target o meno.

Gli indici estratti da questo test includono la somma delle latenze per entrambe le condizioni mediata sul numero dei trial validi della singola condizione (rispettivamente media *Gap* e media *Overlap*) e l'effetto *gap*, calcolato come la differenza tra le due durate medie (Figura 39).

PD	MEDIA GAP	MEDIA OVERLAP	GAP-OVERLAP EFFECT
PD_01	217,60	300,61	-83,01
PD_02			
PD_04	233,04	348,24	-115,20
PD_05			

Figura 39 : Esempio di metriche (in ms) finali estratte dal test Gap-Overlap effettuato a 24 mesi di età corretta. Vengono riportati i risultati per i pazienti 01,02,04,05. I pazienti PD02 e PD05 non hanno prove valide.

Si ipotizza che nei bambini nati pretermine le latenze siano più lunghe sia nel disimpegno che nello spostamento dello sguardo in entrambe le condizioni rispetto ai bambini nati a termine e che l'effetto *gap* sia più pronunciato, con valori di latenza maggiori rispetto ai bambini nati a termine, tuttavia, potrebbero esserci variazioni dovute alle differenze individuali nell'attenzione visiva.

Nel paradigma *Simultaneous Stream Change Detection Task*, la decodifica viene condotta con la medesima metodologia utilizzata nel test precedente, ma le variazioni riguardano i parametri raccolti dall'analisi dei movimenti oculari dei bambini (Figura 40). In particolare, vengono registrati il tempo di ancoraggio e disancoraggio dello stimolo, ovvero viene individuato, per tutta la durata del blocco di trial, ogni istante temporale in cui il bambino fissa o lo stimolo di destra o quello di sinistra e ogni istante temporale in cui abbandona lo stimolo che stava fissando e decide di spostare il proprio sguardo o sull'altro stimolo o da qualche altra parte. La differenza tra l'istante temporale di disancoraggio e quello di ancoraggio permette di calcolare il tempo di detezione dello stimolo, ovvero il tempo in cui il bambino ha fissato lo stimolo. Vengono inoltre registrate le direzioni dello sguardo per discriminare se stava guardando stimoli variabili o fissi, nota a priori la posizione del flusso di stimoli fissi e variabili per quel blocco di trial.

STIMOLO	ON	ENGAGE	DIR	DETECTION	DISENGAGE	DIR
1 FASE	39600	<i>guarda i primi 3 stimoli, il 3° scompare a 42640</i>				
		42640	R	600	43240	C
SET SIZE 1		43280	L	280	43560	C
SF L		44000	L	520	44520	C
SV R		44560	R	320	44880	C
		44920	L	840	45760	R
		45760	R	1560	47320	C
		47760	L	680	48440	fuori
		49480	R	1640	51120	C
		51760	L	520	52280	C
		52320	R	320	52640	/10 s

Figura 40: Esempio di tabella di decodifica per il calcolo delle metriche del test *Simultaneous Stream Change Detection Task*. Viene riportata la tipologia della fase (in questo caso "Set Size 1"), se il flusso di stimoli variabili è a destra o sinistra (in questo caso a destra), il tempo espresso in ms di inizio, di ancoraggio dello stimolo e la direzione dello sguardo.

Le metriche che si possono estrarre da queste variabili includono il tempo totale di fissazione dello stimolo, indipendentemente dalla natura (se fissa o variabile) o numerosità (se "Set Size 1" o 2) degli stimoli e il tempo percentuale di fissazione degli stimoli variabili come percentuale del tempo di fissazione totale per "Set Size 1" o "Set Size 2". Se il tempo percentuale di fissazione per gli stimoli variabili è superiore al 50%, vuol dire che il bambino preferisce il flusso variabile rispetto a quello fisso e ha quindi capacità di memoria almeno pari al set size in questione.

Nel test a 24 mesi, vengono riportati gli stessi parametri, ma con distinzione tra “Set Size 2” e “Set Size 3” e viene misurata anche la preferenza per lo stimolo fisso per il “Set Size 3” (NCP in Figura 41), espressa come il tempo di fissazione più lungo relativo allo stimolo fisso (quindi viene scelto lo stimolo fisso, tra i due, guardato più a lungo) in percentuale del tempo di fissazione totale per il “Set Size 3” (Figura 41). Nel “Set Size 2”, la preferenza al cambiamento espressa in percentuale è ovviamente complementare alla misura di preferenza per lo stimolo fisso; quindi, basta che la preferenza al cambiamento sia superiore al 50% per indicare che il bambino preferisce il cambiamento. Nel “Set Size 3”, invece, perché il bambino mostri una preferenza per il cambiamento, la preferenza percentuale per lo stimolo variabile dovrebbe essere superiore al 33% in media. Tuttavia, questo criterio non basta, perché il bambino potrebbe decidere di ignorare uno dei 3 stimoli. Bisogna quindi valutare se la preferenza al cambiamento per lo stimolo variabile è maggiore della preferenza per lo stimolo fisso.

PD	SET SIZE 2	SET SIZE 3	TLT	NCP
PD_09				
PD_08				
PD_01	0,56603	0,47436	41960	0,41516678
PD_04	0,49790765	0,16854637	10560	0,28320802

Figura 41: Esempio di metriche finali estratte dal test Simultaneous Stream Change Detection Task effettuato a 24 mesi di età corretta. Vengono riportati i risultati per i pazienti 09,08,01,04. TLT= Total looking time, ovvero tempo totale di fissazione. NCP = no change preference.

Dai risultati di questo test, ci si attende che i bambini prematuri dimostrino una minore efficienza nei compiti di riconoscimento visivo rispetto ai loro coetanei a sviluppo tipico, con una preferenza ridotta per lo stimolo variabile, che diminuisce all’aumentare della complessità del test. Questo potrebbe essere attribuito ai limiti delle capacità di memoria di riconoscimento visivo che influenzano la fedeltà della rappresentazione che memorizzano e di conseguenza, le capacità di discriminazione dello stimolo fisso manifestando quindi, una diminuzione della preferenza per lo stimolo variabile.

La valutazione dello sviluppo del bambino mediante le scale Bayley III viene condotta in riferimento a un livello di base stabilito sull’età corretta al momento della valutazione, che nel

caso dei bambini prematuri viene calcolata sottraendo dall'età corrente la differenza tra la data presunta del parto e quella effettiva.

Il livello di base ai 12 mesi di età corretta consiste negli item del gruppo I, dai quali si parte, e la sequenza delle sottoscale (linguistica, motoria o cognitiva) è determinata da osservazioni qualitative condotte dal clinico, spesso basate sulle preferenze espresse dal bambino. Per ciascun item specifico, vengono descritti i comportamenti attesi dal bambino e necessari per poter considerare il compito superato e assegnare il punteggio corrispondente; vengono registrate tutte le prove superate e non ed in caso di successiva esternalizzazione dei comportamenti relativi a determinati item di sottoscale già testati, è possibile correggere il protocollo.

La valutazione si conclude se il bambino non riesce a superare 5 item consecutivi, non rispondendo correttamente alle richieste dello sperimentatore [96].

Il punteggio relativo alla sottoscala socioemozionale viene determinato separatamente (come precedentemente menzionato) mediante l'analisi dei risultati di un questionario somministrato ai genitori.

I punteggi grezzi vengono ottenuti sommando i punteggi ottenuti negli item precedenti al livello di base stabilito e quelli di tutti gli item superati durante la valutazione, facendo riferimento alle tabelle normative contenute nel manuale. Nel contesto dello studio, vengono considerati i punteggi compositi, espressi in centesimi, in cui i valori che si discostano da 100 di +/- 15 sono considerati nella norma (Figura 42).

	<i>Punteggi compositi</i>			
<i>PD</i>	<i>Cognitivo</i>	<i>Linguaggio</i>	<i>Motorio</i>	<i>Socioemozionale</i>
PD12	100	97	100	120
PD13	80	89	79	110
PD14	100	89	88	90
PD15	100	100	85	105

Figura 42: Esempio di metriche finali estratte dalla valutazione delle Scale Bayley III effettuato a 12 mesi di età corretta. Vengono riportati i risultati per i pazienti 12,13,14,15.

4.6 Correlazione tra le matrici di connettività funzionale e le metriche del neurosviluppo

La correlazione è condotta tra i valori delle matrici di connettività funzionale, appartenenti alla porzione triangolare superiore (poiché questa matrice è simmetrica) e le metriche dello sviluppo, che, come visibile nella Tabella 2 esse possono essere presenti o assenti per i diversi pazienti. Questa analisi di correlazione viene effettuata separatamente per ciascuna delle metriche estratte dai test di neurosviluppo, considerando le 36 coppie di ROI per HbO e successivamente per HbR. La scelta di operare questa divisione è apportata al fine di evitare l'esclusione di ulteriori pazienti dall'analisi, dato che la presenza di dati mancanti varia per ogni metrica e ogni coppia di ROI. Inizialmente, le correlazioni significative sono individuate senza applicare correzioni per i confronti multipli come parte di un'analisi esplorativa dei risultati.

Le correzioni per i confronti multipli vengono successivamente eseguite, poiché il numero di campioni è limitato e l'individuazione di risultati significativi è complessa in questa fase iniziale. Le correzioni coinvolgono la modifica del livello di significatività in relazione ai 36 confronti effettuati per ciascuna metrica. Qui abbiamo utilizzato sia la correzione di Bonferroni, precedentemente descritta, che la correzione False Discovery Rate [130], la quale è meno conservativa e fornisce un migliore equilibrio tra minimizzazione dell'errore di tipo II e il controllo dell'errore di tipo I.

L'analisi è condotta separatamente per i vari test sullo sviluppo a causa della natura differenziata delle metriche, che comprendono sia valutazioni cliniche che compiti sperimentali eseguiti al computer. Inoltre, il tasso di successo nella raccolta accurata dei dati dai pazienti è relativamente basso nei test sperimentali, pertanto, al fine di ottimizzare l'utilizzo dei dati a disposizione, è necessario suddividere le metriche.

Per quanto riguarda le metriche del *Gap-Overlap* e del *Simultaneous Stream Change Detection Task* viene eseguito un test sulla normalità, condotto mediante la funzione *swtest* in MATLAB, che costituisce un requisito essenziale per l'applicazione della correlazione di Pearson. Nel caso in cui i dati siano approssimabili a una distribuzione gaussiana viene eseguita quest'ultima tipologia di correlazione tra i valori estratti dalle matrici FC, per ogni coppia di ROI, e la metrica dello sviluppo; nel caso in cui questa approssimazione non dovesse essere possibile viene applicata la correlazione di Spearman, adatta per dati almeno ordinali o intervallari, la quale non richiede la normalità dei dati.

Inoltre, è necessario verificare la presenza di eventuali *outliers* nei dati raccolti nei test, dal momento che la correlazione di Pearson è estremamente sensibile alla loro presenza, poiché si basa sulla normalizzazione della covarianza, utilizzando il prodotto delle deviazioni standard delle due variabili messe a confronto. Gli *outliers* potrebbero avere un impatto sproporzionato su questi calcoli in quanto distano significativamente dalla media, alterando così la relazione tra le variabili stesse. Al contrario, la correlazione di Spearman è più robusta e meno sensibile agli *outliers* poiché si basa sui ranghi delle osservazioni anziché sui loro valori reali. In questo studio, tuttavia, non è stato necessario rimuovere dati a causa della presenza di *outliers*, nonostante siano stati identificati due dati provenienti dal tempo totale di fissazione nel *Simultaneous Stream Change Detection Task*, relativi al PD1 e al PD33 ai 12 mesi di età corretta, che presentano una significativa deviazione dalla media. Questi pazienti mostrano valori più elevati rispetto agli altri pazienti per questa metrica, ma va altresì considerato che per quest'ultima verrebbe applicata la correlazione di Spearman, indipendentemente dalla loro inclusione nell'analisi, pertanto, è stata presa la decisione di non escluderli.

Le funzioni utilizzate per il calcolo della correlazione derivano dal toolbox *Robust-Correlations-2* [131]–[138]. In particolare, la funzione di Spearman restituisce il valore di correlazione, il p-value corrispondente, un indicatore di significatività statistica e l'intervallo di confidenza associato, valutato mediante il metodo di ricampionamento *bootstrap*. La funzione di Pearson è la seconda funzione utilizzata nel pacchetto e presenta lo stesso tipo di output della precedente; in generale, i dati in input per questi due test vengono normalizzati al fine di renderli confrontabili.

Nel contesto delle Scale Bayley III è necessario applicare la correlazione di Spearman a tutte le sottoscale in quanto le metriche sono categoriche ordinate.

Le correlazioni vengono calcolate tra tutte le combinazioni di metriche, sia a 12 mesi di età corretta che a 24 mesi e i valori delle matrici di connettività funzionale (per HbO e successivamente per HbR), seguendo lo stesso approccio.

Inoltre, abbiamo condotto il test di Kruskal-Wallis, basato sui punteggi ottenuti dalle Scale Bayley III, sia ai 12 che ai 24 mesi di età corretta, che per ognuna delle due matrici di connettività funzionale (HbO e HbR). L'obiettivo del test è valutare l'eventuale presenza di differenze tra tre gruppi, distinti in base ai punteggi delle singole sottoscale: normalità, con punteggi compresi tra 100 +/- 15; sotto-normalità, con punteggi inferiori all'85; sopra-

normalità, con punteggi superiori al 115, in relazione ai valori presenti nelle matrici di connettività funzionale.

Il test di Kruskal-Wallis è una procedura non parametrica basata su ranghi ed è stata scelta in quanto permette di confrontare gruppi con diverse dimensioni e dati almeno ordinali e risulta particolarmente indicato anche quando si hanno campioni con ridotta numerosità (anche un campione per gruppo), facendo uso di una distribuzione della statistica basata su una tabella specifica.

Per eseguire l'analisi, viene utilizzata la funzione *kruskalwallis* disponibile in MATLAB, la quale restituisce il *p-value* dell'ipotesi nulla (= non ci sono differenze significative tra le mediane dei gruppi) e una matrice contenente informazioni dettagliate, tra cui i nomi dei gruppi e la loro numerosità. Se l'ipotesi nulla viene respinta, è possibile procedere con l'identificazione dei gruppi che risultano statisticamente differenti attraverso la funzione *multcompare*, che restituisce una matrice dei confronti a coppie insieme ai relativi *p-value* corretti per confronti multipli utilizzando Bonferroni.

CAPITOLO 5: RISULTATI

5.1 Risultati dell'analisi glicemica

In questo capitolo vengono riportati i risultati riguardanti l'analisi glicemica che fungono da discriminanti nella selezione dei pazienti per l'analisi dei dati NIRS.

Per ciascun paziente, utilizzando l'algoritmo spiegato precedentemente, vengono estratte diverse caratteristiche relative ai periodi di euglicemia, tra cui il conteggio degli intervalli, la loro durata totale e mediana, la deviazione media assoluta delle durate, nonché le durate massime e minime. Vengono inoltre registrati la distanza temporale dall'inizio dell'acquisizione, il numero di eventi ipoglicemici o iperglicemici precedenti al primo intervallo di euglicemia, la durata del primo intervallo euglicemico e il numero di interruzioni temporali (gap) che sono stati corretti. Le misure temporali sono espresse in minuti e le metriche più rilevanti sono presentate nella Tabella 4 a corredo dell'analisi.

	N totale EU	EU totale (min)	Distanza dall'inizio (min)	N eventi prima dell'EU	Durata della prima EU (min)	N gap corretti
PD1	5	2380	0	0	1950	2
PD2	4	5165	0	0	45	4
PD4	11	4360	0	0	1060	1
PD5	13	3660	0	0	10	4
PD7	24	2090	0	0	65	0
PD8	12	4385	0	0	185	1
PD9	10	3405	0	0	125	0
PD11	3	1065	0	0	205	0
PD12	3	1970	0	0	1495	0
PD13	7	4145	0	0	135	0
PD14	5	1020	0	0	40	0
PD15	11	3115	0	0	885	0
PD16	5	4255	1000	1	140	0

PD20	14	6715	0	0	80	3
PD22	4	3435	290	1	70	1
PD23	6	4065	0	0	180	1
PD24	4	1390	95	1	30	1
PD25	7	4970	0	0	150	3
PD26	11	2360	150	1	20	0
PD28	4	855	0	0	370	0
PD33	24	2180	0	0	120	0
PD34	3	210	1150	1	120	1
PD35	17	5115	0	0	20	2
PD36	9	3840	0	0	180	3
PD37	16	1495	0	0	5	1
PD38	16	4685	60	1	120	2
PD39	3	625	0	0	240	1
PD40	3	3915	0	0	180	1
PD41	5	4445	45	1	45	4

Tabella 4: Riepilogo delle metriche di euglicemia più rilevanti per ciascun paziente. EU=euglicemia. Il colore verde evidenzia l'assenza di eventi all'inizio dell'acquisizione. Il colore giallo evidenzia pazienti con un periodo nel primo intervallo glicemico estremamente ridotto.

Ciò che è importante notare osservando tali metriche è la presenza di eventi precedenti al primo intervallo di euglicemia, poiché è proprio la caratteristica che implica l'esclusione del paziente dall'analisi, nello specifico i pazienti PD16, PD22, PD24, PD26, PD34, PD38 e PD41 non saranno presenti nelle analisi successive. Si ricorda che la motivazione di questa esclusione sta nell'obiettivo dello studio, ovvero studiare l'attività cerebrale del neonato il più presto possibile senza che questa venga compromessa da eventi glicemici; nel caso di questi pazienti vi è evidenza della presenza di uno di questi episodi precedentemente al primo periodo euglicemico. Negli altri neonati presi in esame, non è noto cosa accada in precedenza e non è possibile supporlo, ignorando l'andamento glicemico prima dell'inizio dell'acquisizione, ma essendo il paziente in euglicemia al suo inizio possiamo solo ipotizzare che la variabilità glicemica prima dell'inizio sia minima.

Un altro aspetto valutabile osservando i dati riportati in tabella è la durata di questo primo intervallo in quanto permette di comprendere quante finestre, nel caso in cui tutto il periodo di tempo sia compreso nelle acquisizioni NIRS, vengono valutate nel processo di selezione della finestra temporale migliore e l'ampiezza della possibilità di scelta. Interessante notare nello specifico PD5 e PD37, nei quali il tempo trascorso nella prima finestra di euglicemia è estremamente ridotto e nel caso del secondo paziente si parla di una singola finestra valutata il che rende la probabilità dell'inclusione nelle analisi successive molto più bassa rispetto agli altri.

Ulteriori informazioni vengono estratte anche per gli eventi glicemici, ma non sono riportate in questa analisi in quanto non rilevanti per lo scopo specifico dello studio.

5.1.1 Valutazione della prima finestra di euglicemia

In seguito all'esclusione di 7 pazienti su 29 è necessario verificare se l'acquisizione glicemica e quella cerebrale hanno in comune l'intervallo di tempo della prima euglicemia; ciò avviene sincronizzando le due acquisizioni.

PD	INIZIO NIRS (data)	INIZIO EU (data)	TEMPO COMUNE	PD	INIZIO NIRS (data)	INIZIO EU (data)	TEMPO COMUNE
1	24 Mar 16:42	24 Mar 18:35	32h 30min	15	15 Lug 16:46	16 Lug 14:05	12h 04min
2	29 Mar 12:55	29 Mar 15:12	00h 45min	20	10 Nov 18:43	10 Nov 22:27	01h 20min
4	12 Apr 11:57	12 Apr 15:50	17h 40min	23	21 Gen 15:19	20 Gen 21:41	00h
5	16 Apr 13:42	17 Apr 00:00	00h 10min	25	03 Mar 18:14	04 Mar 19:12	02h 30min
7	26 Apr 16:15	24 Apr 22:50	00h	28	07 Apr 18:11	07 Apr 19:47	06h 10min
8	02 Mag 16:21	02 Mag 19:34	03h 05min	33	07 Set 18:47	07 Set 21:42	02h 00min
9	09 Mag 01:22	08 Mag 23:54	00h 37min	35	05 Ott 19:26	05 Ott 23:06	00h 20min
11	28 Mag 17:13	28 Mag 21:18	03h 25min	36	19 Ott 18:02	19 Ott 19:08	03h 00min
12	11 Giu 10:00	10 Giu 00:43	00h	37	24 Nov 18:57	24 Nov 21:36	00h 05min
13	15 Giu 18:22	13 Giu 20:03	00h	39	14 Gen 17:46	14 Gen 17:56	04h 00min
14	22 Giu 16:32	23 Giu 20:43	00h 40min	40	17 Feb 09:20	17 Feb 06:34	00h 14min

Tabella 5: Pazienti con inizio dell'acquisizione glicemica in un intervallo euglicemico. Viene riportata la data di Inizio della NIRS, la data di inizio dell'euglicemia, e il tempo comune tra le due acquisizioni espresso in ore e minuti. I pazienti con tempo comune sono evidenziati in verde, mentre i pazienti senza tempo comune sono evidenziati in rosso.

In Tabella 5 sono inclusi i pazienti il cui processo di acquisizione dei dati glicemici ha inizio in un intervallo temporale di euglicemia; tra questi pazienti, sono stati distinti visivamente in verde i 18 casi in cui è stata documentata l'acquisizione dei dati NIRS che copre, almeno in parte, questo intervallo.

5.2 Esiti dell'analisi dei segnali fNIRS

In questo capitolo verranno riportati i risultati riguardanti l'analisi NIRS fino alla generazione delle matrici di connettività funzionale, realizzati tramite un algoritmo semiautomatico; il quale necessita di un'analisi specifica per ogni paziente in modo da escludere determinati canali, non informativi, sulla base delle caratteristiche della acquisizione. L'analisi è stata eseguita per tutti i neonati compresi in questo studio, ma un obiettivo futuro sarà la modifica dell'algoritmo al fine di renderlo applicabile a tutti i pazienti in modo automatico.

5.2.1 Selezione della finestra temporale ottimale

Nella colonna "tempo in comune" nella Tabella 5, è stato riportato il tempo espresso in minuti che le due acquisizioni coprono contemporaneamente, senza però considerare se eventuali acquisizioni NIRS presentano degli intervalli non coperti; perciò, nella Figura 43 è presentata la quantità effettiva di finestre esaminate per ciascun paziente, con l'obiettivo di identificare la scelta più vantaggiosa tra le opzioni presenti.

Al termine dell'identificazione della finestra ottimale vengono riportate (in Figura 44, 45, 46) le specifiche di quest'ultima, per ciascun paziente, in modo tale da avere un'idea della qualità di quella individuata.

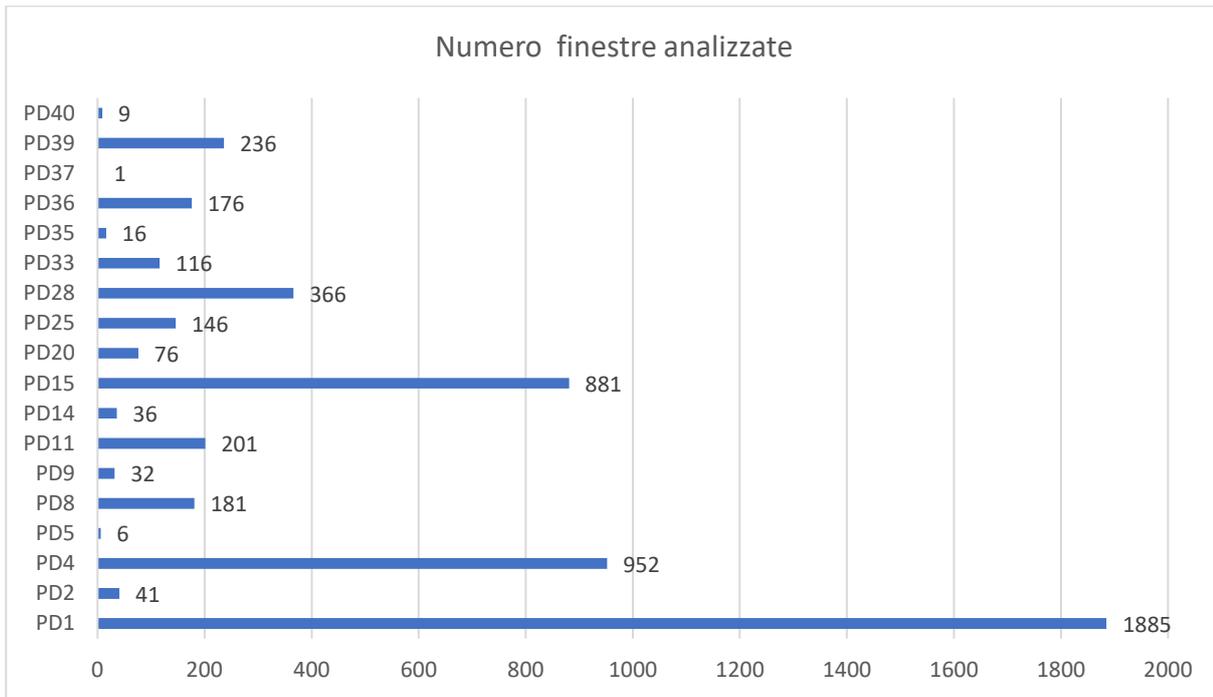


Figura 43: Numero di finestre analizzate per ciascun paziente.

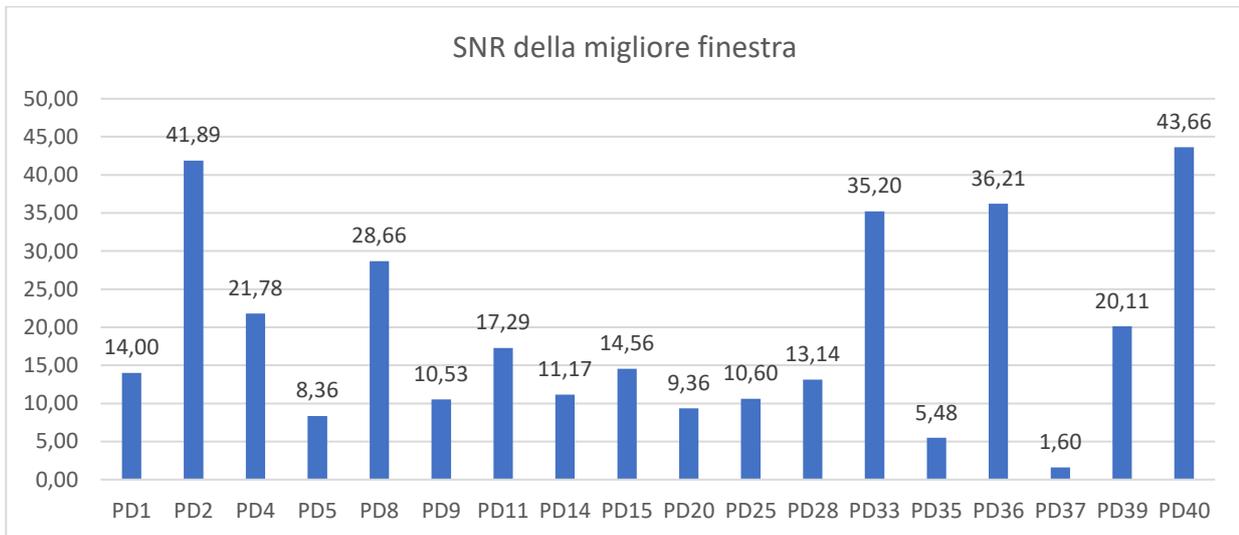


Figura 44: Valore SNR della finestra ottimale per ciascun paziente.

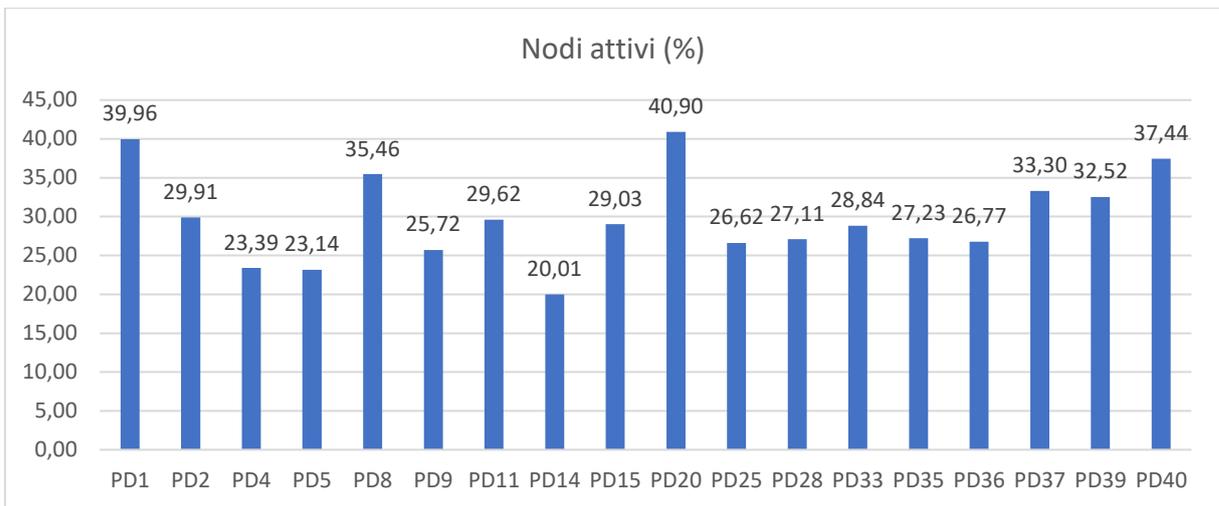


Figura 45: Numero dei nodi attivi espressi in percentuale sulla base del numero di nodi presenti nelle mesh volumetriche specifiche utilizzate per ciascun paziente della finestra ottimale.

I valori espressi in percentuale del numero dei nodi sensibili sono molto ridotti rispetto al totale dei nodi contenuti nella mesh volumetrica (scelta sulla base dell'età gestazionale espressa in settimane e il peso alla nascita per ciascun paziente), poiché la NIRS, che utilizza la luce nel vicino infrarosso per acquisire le variazioni nell'emodinamica cerebrale, possiede una profondità di penetrazione limitata adatta a misurare i cambiamenti nell'ossigenazione a livello dei tessuti superficiali e nel caso del cervello a livello della corteccia.

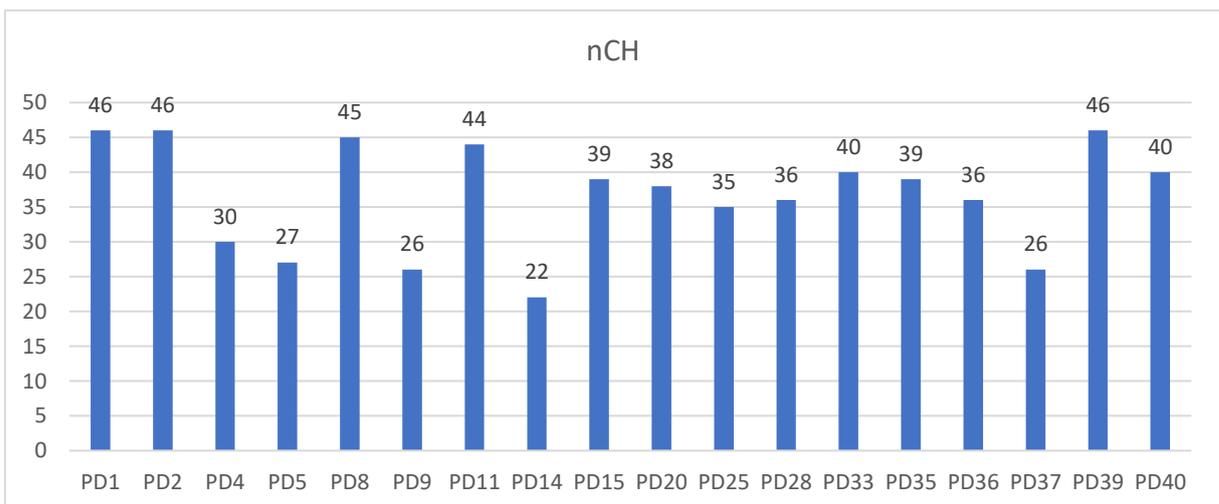


Figura 46: Numero dei canali buoni della finestra ottimale per ciascun paziente.

La rimozione dei canali non informativi ed eccessivamente rumorosi è stata eseguita utilizzando una modalità che prevedeva l'esclusione di canali regolari non eliminabili utilizzando una soglia sull'intensità e sul rapporto segnale e rumore. L'utilizzo del criterio basato sulla potenza del segnale permette di eliminare dei segnali se presentano una potenza superiore a una determinata soglia per uno specifico range di frequenze e ha permesso una corretta esclusione dei canali regolari senza la necessità di aumentare la soglia sull'SNR, la quale avrebbe portato all'eliminazione di segnali informativi.

Nelle figure sottostanti (47, 48, 49 e 50) vengono riportati degli esempi di segnali nella finestra ottimale che sono stati suddivisi per lunghezza d'onda e per canali eliminati o mantenuti.

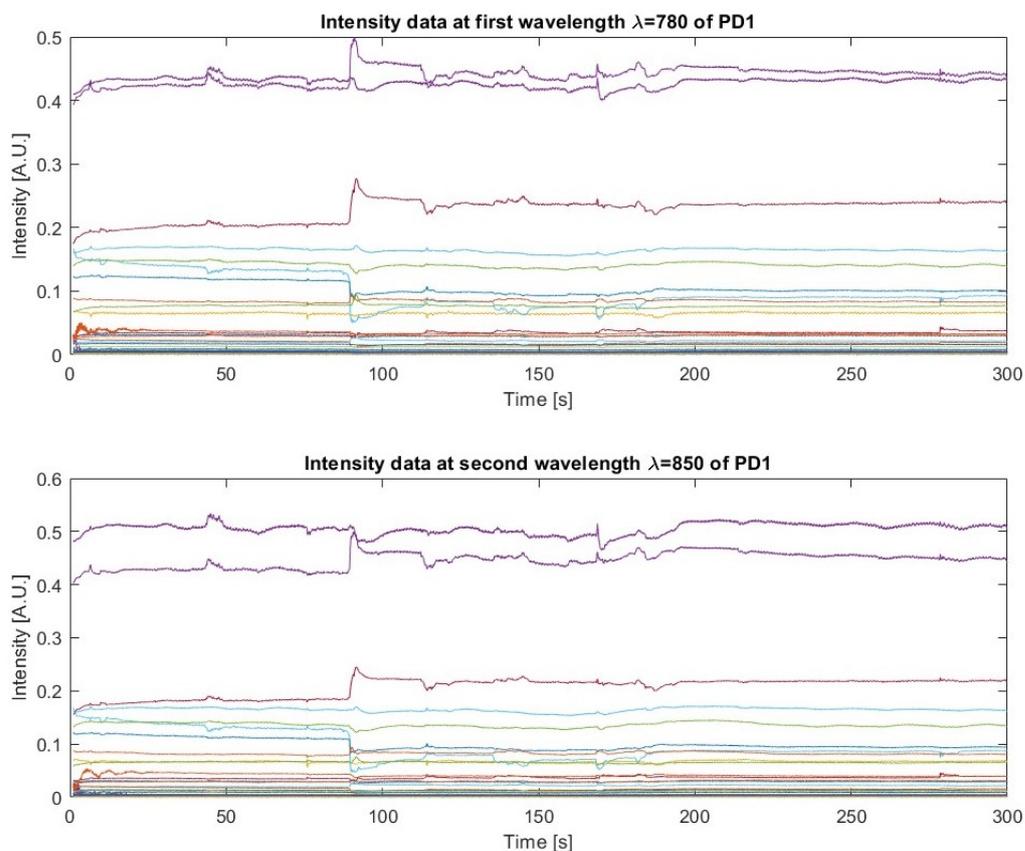


Figura 47: Grafico del segnale registrato, per ogni canale informativo, nel tempo. In alto sono riportate le intensità ottiche per la prima lunghezza d'onda, sotto per la seconda (riferito a PD1).

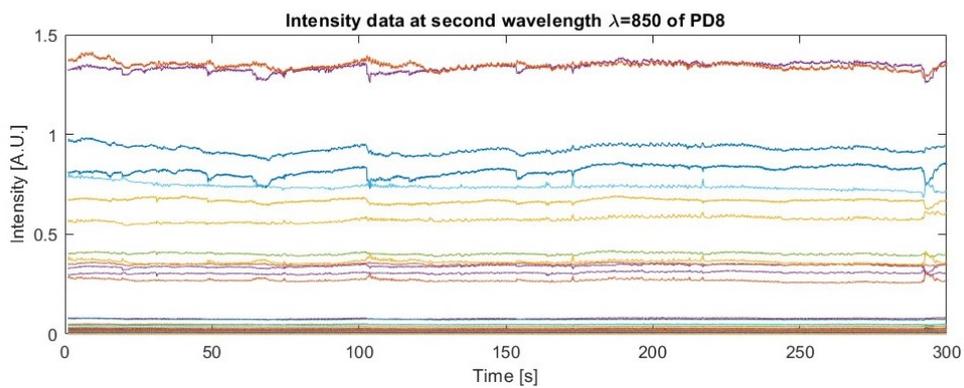
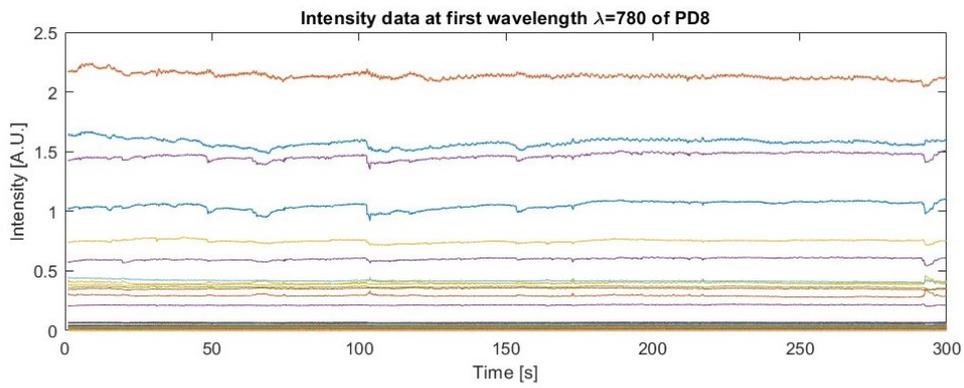
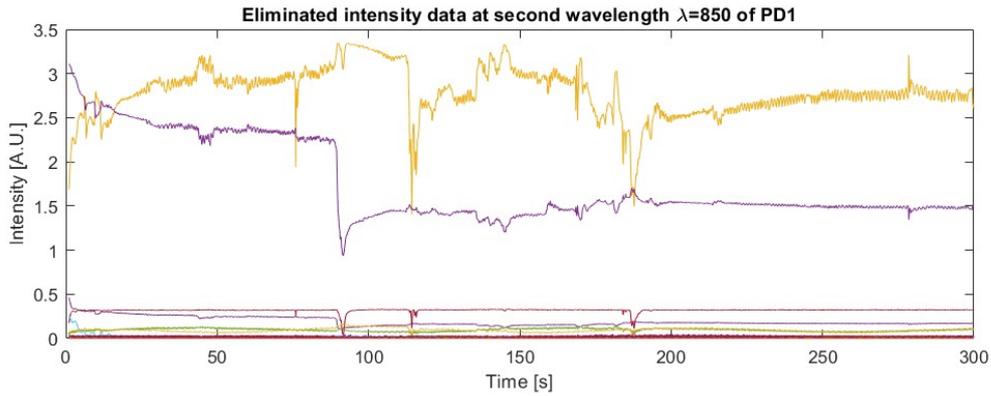
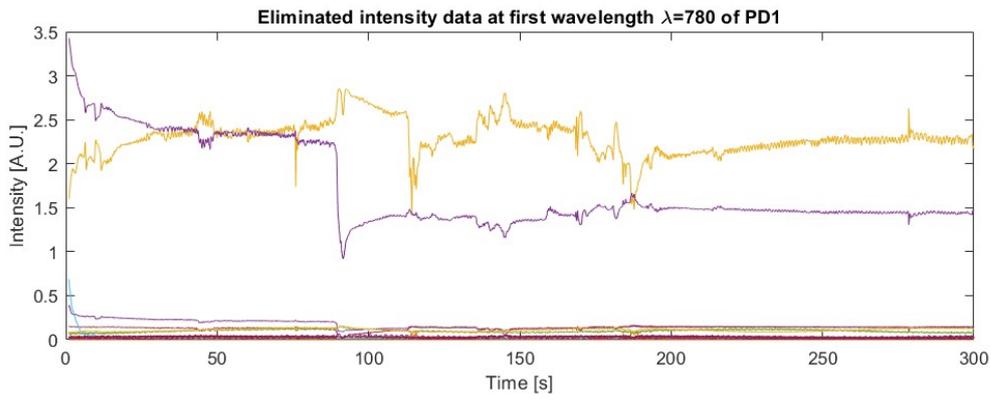


Figura 48:
 Grafico del segnale registrato, per ogni canale troppo rumoroso o non sufficientemente informativo, nel tempo. In alto sono riportate le intensità ottiche per la prima lunghezza d'onda, sotto per la seconda (riferito a PD1).

Figura 49:
 Grafico del segnale registrato, per ogni canale informativo, nel tempo. In alto sono riportate le intensità ottiche per la prima lunghezza d'onda, sotto per la seconda (riferito a PD8).

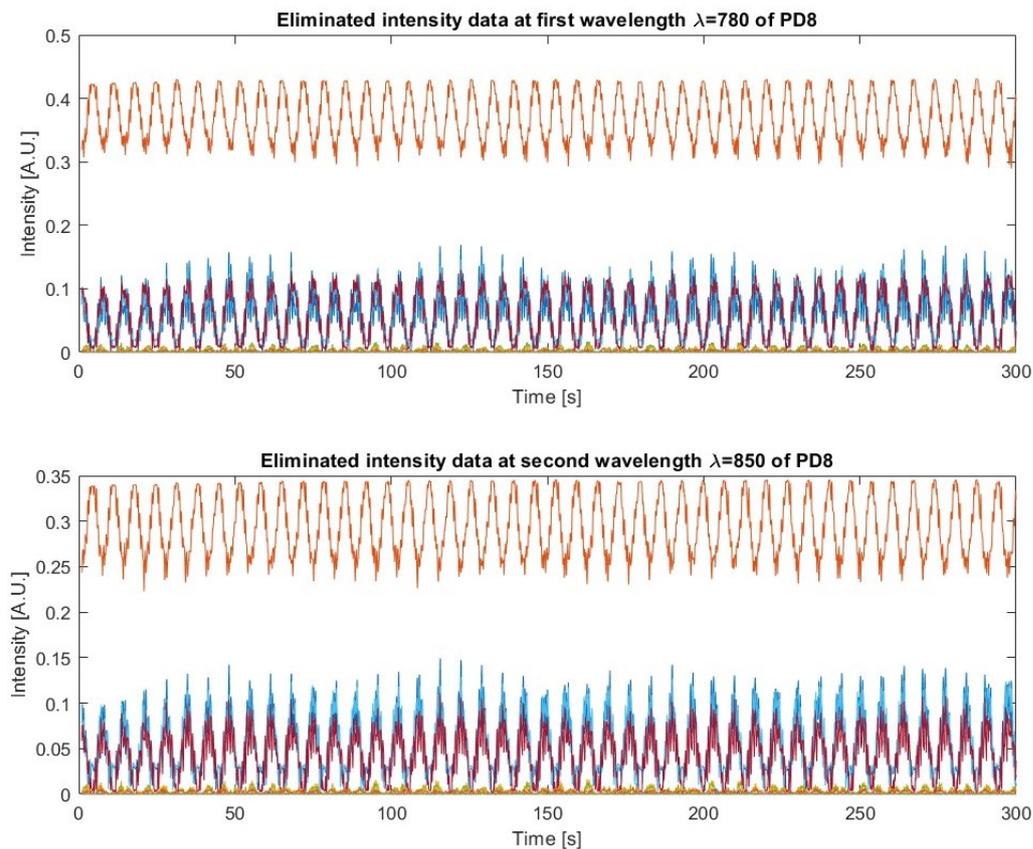


Figura 50: Grafico del segnale registrato, per ogni canale troppo rumoroso o non sufficientemente informativo, nel tempo. In alto sono riportate le intensità ottiche per la prima lunghezza d'onda, sotto per la seconda (riferito a PD8).

La scelta di PD1 e PD8 come rappresentativi dell'applicazione del secondo criterio per la discriminazione della finestra ottimale è stata operata al fine di mettere a confronto un'eliminazione basata prettamente sul criterio dell'SNR e dell'intensità del segnale rispetto all'eliminazione eseguita principalmente sulla base della potenza in frequenza con l'obiettivo di escludere canali regolari. Tale estromissione nel PD8 risulta riuscita con successo e sottolinea la validità di tale criterio, poiché ha permesso di mantenere 45 canali informativi, discriminando con successo quelli che non lo sono.

Il numero e la distribuzione dei canali buoni influenzano le regioni cerebrali coinvolte nel contributo ai segnali rilevati a livello dello scalpo, poiché il numero di nodi sensibili viene massimizzato sulla base di questa caratteristica. Per tanto vengono riportate tre situazioni rappresentative per consentire una valutazione delle specifiche scelte nelle Figure 51, 52 e 53,

le quali, a loro volta, permettono di osservare la disposizione spaziale dei canali informativi che vengono mantenuti nel processo di rimozione. I canali rimossi più frequentemente sono quelli con distanza sorgente-detettore più elevata, perché raccogliendo informazione da un più ampio volume cerebrale (dato dalla maggiore distanza tra la sorgente e il rilevatore), sono spesso i più rumorosi o meno intensi.

Inoltre, vengono mostrate le rappresentazioni della matrice Jacobiana riferita agli 850nm, nella quale, le zone corticali con valori più elevati sono quelle di color violaceo e contribuiscono in maggior misura al segnale acquisito sulla superficie cutanea. Queste sono state realizzate sulla mesh volumetrica dell'atlante associata al paziente: quella sulla destra è la rappresentazione dello Jacobiano se tutti i canali fossero considerati, mentre quella a sinistra è la rappresentazione dello Jacobiano, andando a rimuovere i canali non informativi specifici per il singolo neonato; permettendo, in questo modo, una visualizzazione delle aree corticali che effettivamente contribuiscono al segnale.

In PD1 i 18 canali che vengono eliminati sono quelli più lunghi e la matrice di sensitività del paziente, sebbene perda parte del contributo derivante da questi, è ben distribuita spazialmente garantendo una sensitività uniforme sulla corteccia nell'area coperta dagli optodi.

PD14 è il paziente che presenta un numero di canali e nodi sensibili inferiore rispetto a tutti gli altri, infatti, osservando le figure riferite a quest'ultimo, è evidente la perdita della copertura in special modo nella zona frontale.

PD5 è stato selezionato in quanto presenta una situazione di poco migliorata rispetto alla precedente e rende possibile l'osservazione di un caso nel quale il numero di canali informativi aumenta da 22 a 26, permettendo una distribuzione a livello spaziale più estesa e perciò in grado di coprire, seppur con contributi inferiori provenienti dai singoli nodi, la corteccia cerebrale.

Channel configuration of PD1

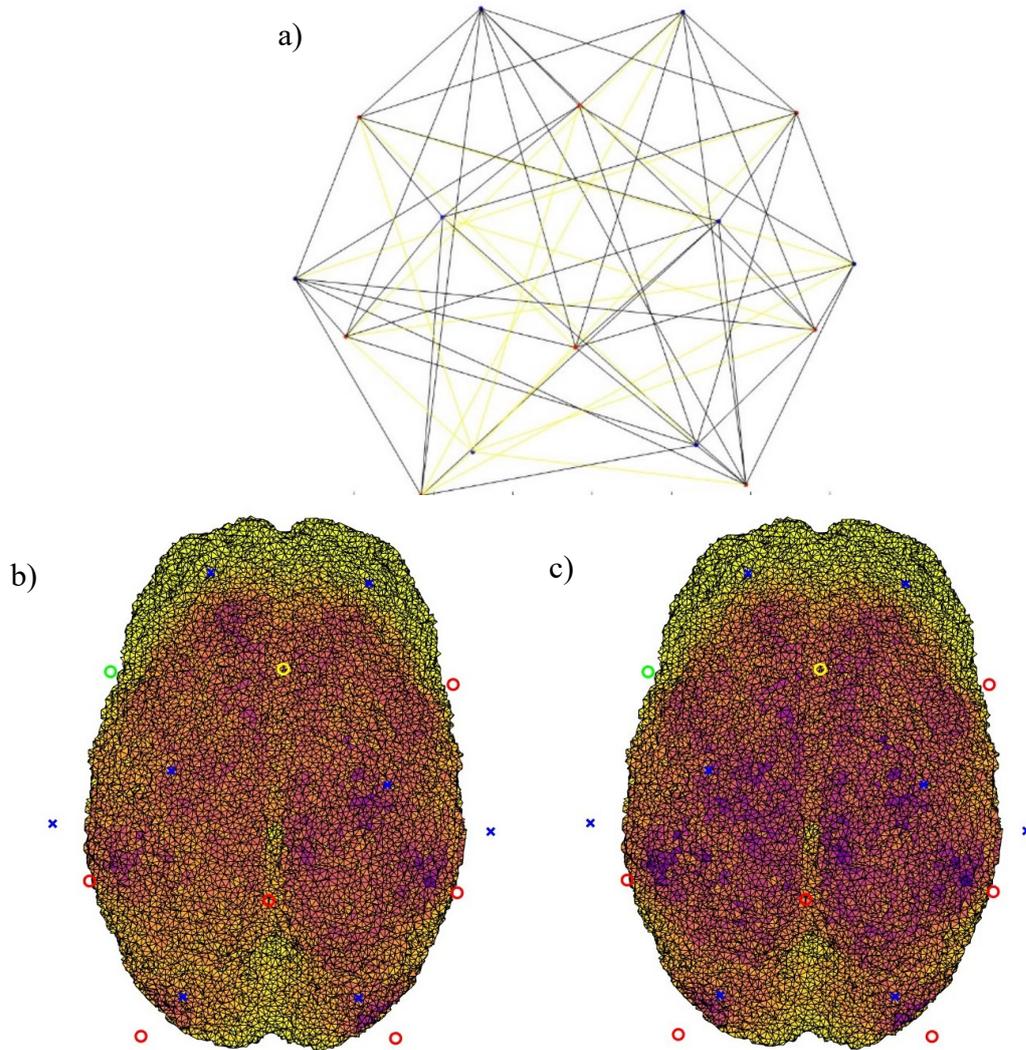


Figura 51: a) Rappresentazione spaziale dei canali rimossi, in giallo, e mantenuti, in nero. B) Rappresentazione su mesh volumetrica, specifica per il paziente, della matrice di sensitività considerando solo i canali informativi e non quelli rimossi. c) Rappresentazione della matrice di sensitività considerando tutti i canali. Queste informazioni sono riportate per il PD1.

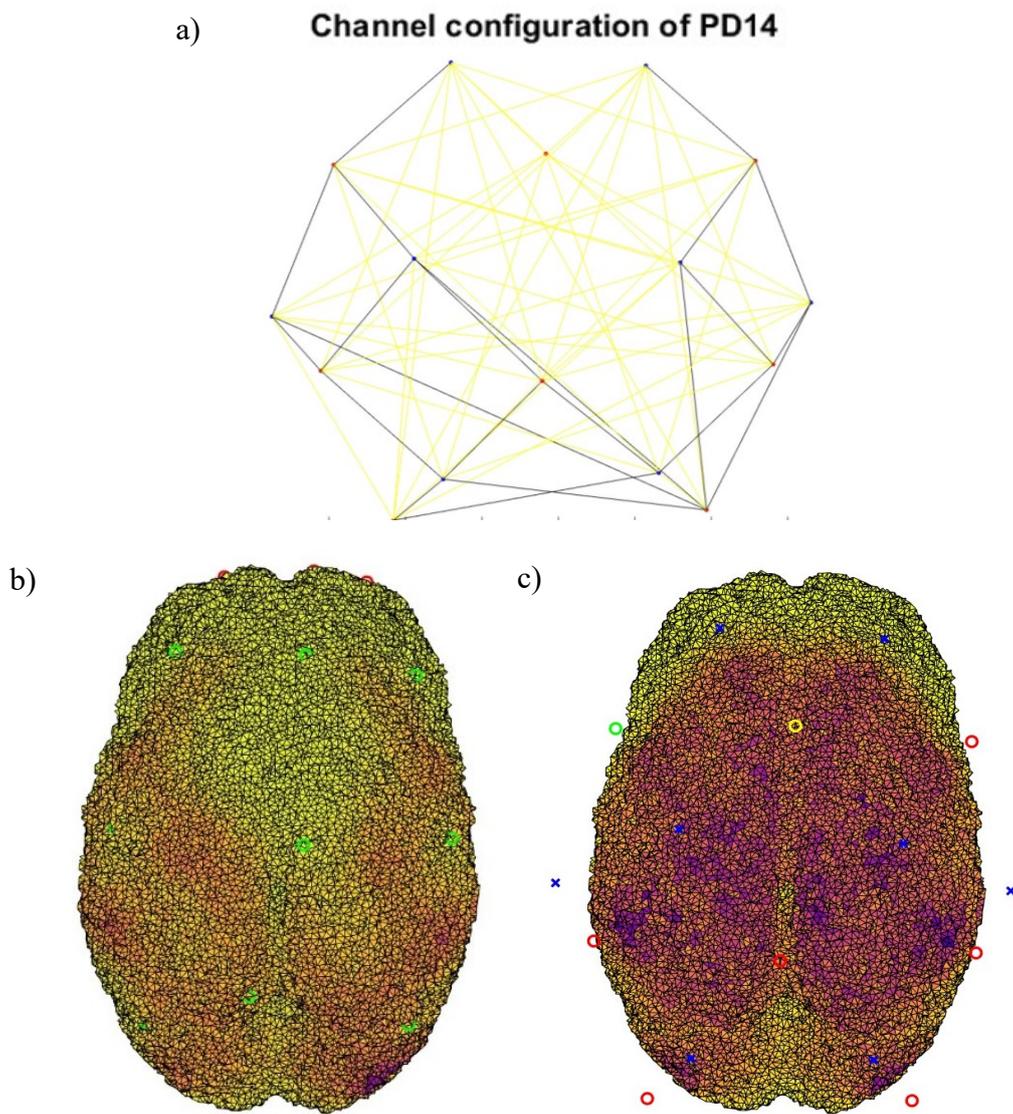


Figura 52: a) Rappresentazione spaziale dei canali rimossi, in giallo, e mantenuti, in nero. B) Rappresentazione su mesh volumetrica, specifica per il paziente, della matrice di sensibilità considerando solo i canali informativi e non quelli rimossi. c) Rappresentazione della matrice di sensibilità considerando tutti i canali. Queste informazioni sono riportate per PD14.

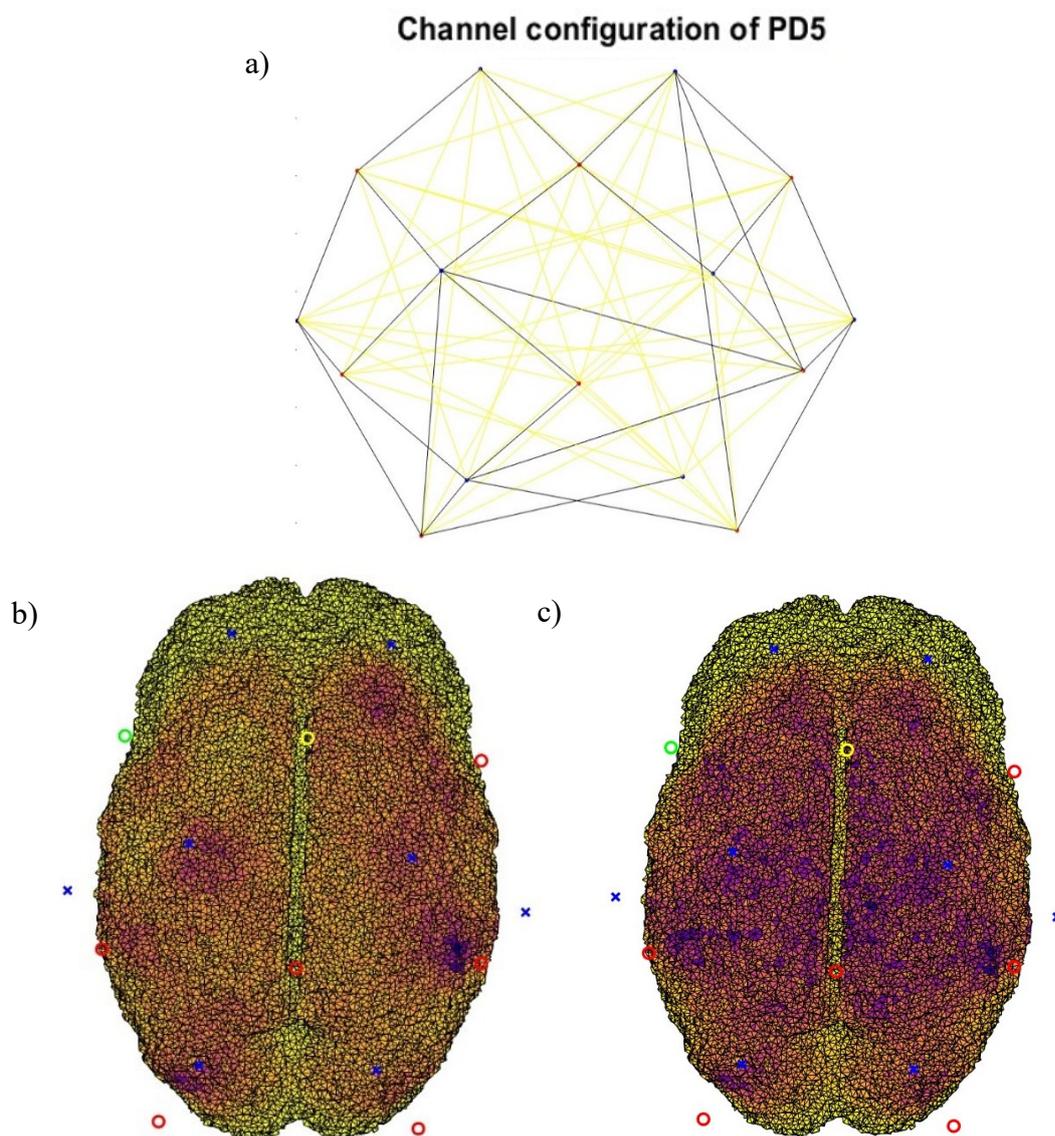


Figura 53: a) Rappresentazione spaziale dei canali rimossi, in giallo, e mantenuti, in nero. B) Rappresentazione su mesh volumetrica, specifica per il paziente, della matrice di sensitività considerando solo i canali informativi e non quelli rimossi. c) Rappresentazione della matrice di sensitività considerando tutti i canali. Queste informazioni sono riportate per PD5.

5.2.2 Connettività funzionale

La connettività funzionale riferita allo stato di riposo consiste nell'analisi dell'attività neuronale spontanea a bassa frequenza, al fine di esplorare la presenza di interconnessioni tra aree cerebrali, sia anatomicamente adiacenti che non, in un cervello non ancora maturato completamente. Il risultato sono due matrici FC, una riferita alle variazioni di deossiemoglobina e l'altra di ossiemoglobina, in grado di descrivere, per ciascuna coppia di ROI, il livello di intensità degli accoppiamenti interregionali.

Nelle Figure 54, 55, 56 e 57 sono riportate, a scopo esemplificativo, le matrici di connettività riferite a PD14, PD9, PD4 e PD15, per HbO e HbR, dove le regioni sono state ordinate sulla base della loro posizione anatomica nella corteccia, dalle zone frontali a quelle parietali, permettendo di creare una mappa delle attivazioni corticali cerebrali.

La correlazione di Pearson, utilizzata per la realizzazione delle matrici FC, è una misura statistica simmetrica che rimane invariata indipendentemente dall'ordine in cui le variabili sono inserite nel calcolo; questo implica che la misurazione non è in grado di fornire una direzionalità o una causalità dell'interazione tra aree cerebrali. Di seguito vengono riportate le indicazioni per una corretta lettura delle matrici:

- le correlazioni sulla diagonale sono tutte pari a 1, indicando che la correlazione di un'area con sé stessa è sempre massima per definizione;
- i voxel con tonalità tendenti al blu sono associati a regioni cerebrali con correlazioni sempre più negative, ovvero l'aumento dell'attività in una regione porta nell'altra una diminuzione e l'intensità del colore blu indica un'interazione funzionale inversa più marcata;
- i voxel tendenti al colore rosso rappresentano aree cerebrali con correlazioni positive, dove un aumento o una diminuzione dell'attività avvengono contemporaneamente nelle due aree e l'intensità del colore rosso indica un'interazione funzionale diretta più marcata;
- le correlazioni tendenti a 0 indicano che non è presente un'interazione funzionale di nessun tipo tra le due ROI.

Le matrici di connettività funzionale di PD14 (Figura 54) non presentano correlazioni con le aree cerebrali frontali F3 e Fz, figuranti come valori non validi (NaN), in quanto queste ROI per questo paziente erano state escluse per carenza di sensibilità dell'array dopo la rimozione dei canali rumorosi. Per quanto riguarda i restanti valori di correlazione, questi non presentano un pattern simile tra HbO e HbR nella maggior parte delle correlazioni tra ROI; questa caratteristica è più marcata nel caso di PD9 riportato in Figura 55.

Pattern simili vengono individuati nella maggior parte degli altri pazienti, tra i quali PD4 e PD15 riportati rispettivamente nelle Figure 56 e 57, dove questa caratteristica è presente per tutte le correlazioni tra ROI.

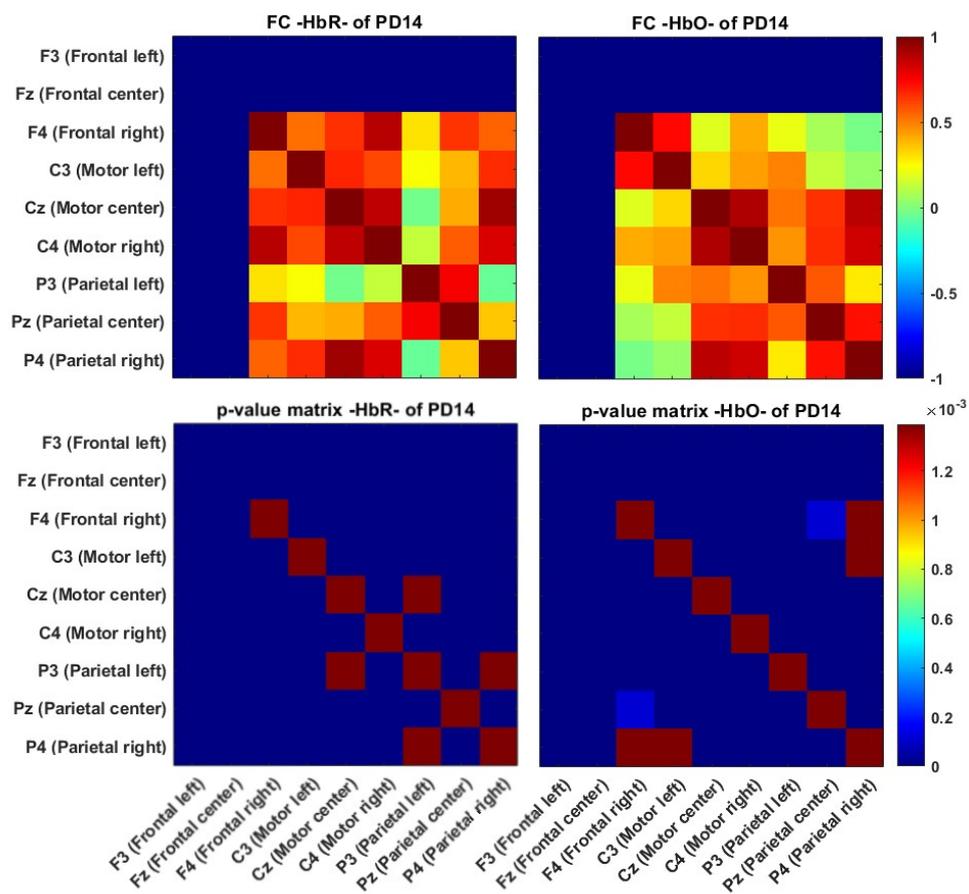


Figura 54: Matrici di FC con intervallo $[-1 \ 1]$ (in alto). I p-value corretti con Bonferroni corrispondenti a un intervallo di $[0 \ 1.4e-3]$ (in basso). I colori caldi indicano una correlazione positiva tra le aree, mentre i colori freddi indicano un'anti-correlazione. Gli assi mostrano le ROI insieme ai rispettivi punti di riferimento nel sistema 10-20. Le rappresentazioni sono riferite a PD14.

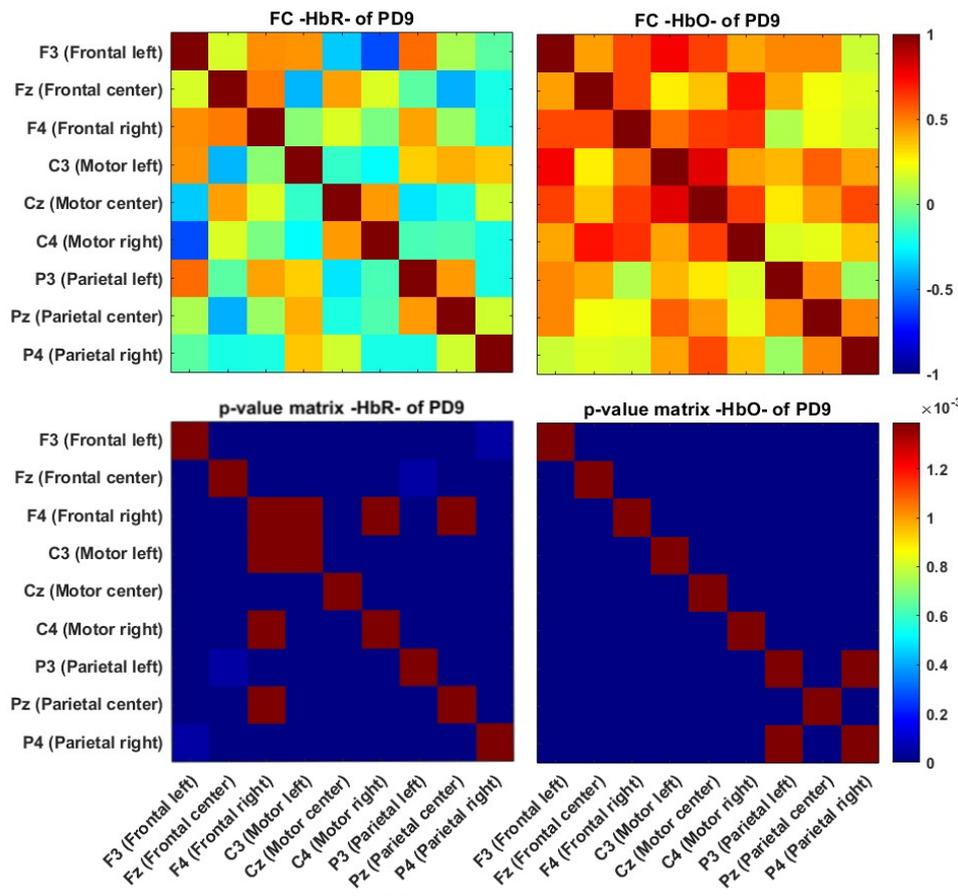


Figura 55: Matrici di FC (in alto). I p-value corretti con Bonferroni (in basso). Le rappresentazioni sono riferite a PD9.

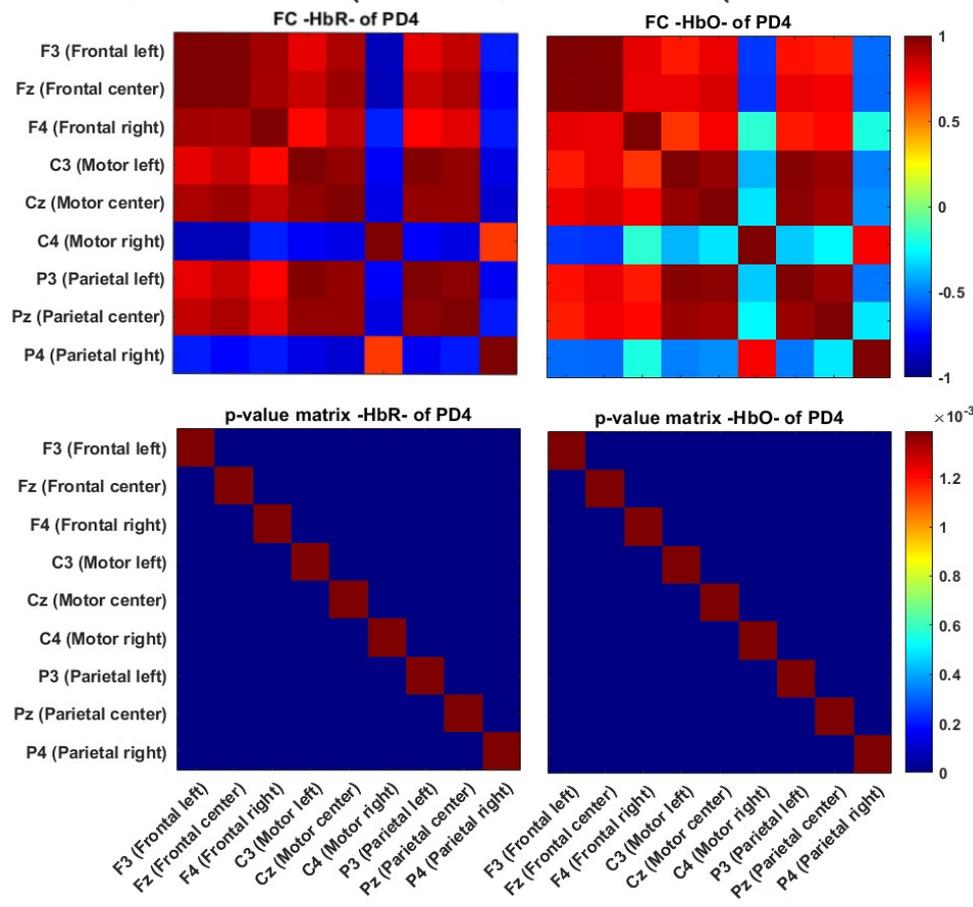


Figura 56: Matrici di FC (in alto). I p-value corretti con Bonferroni (in basso). Le rappresentazioni sono riferite a PD4.

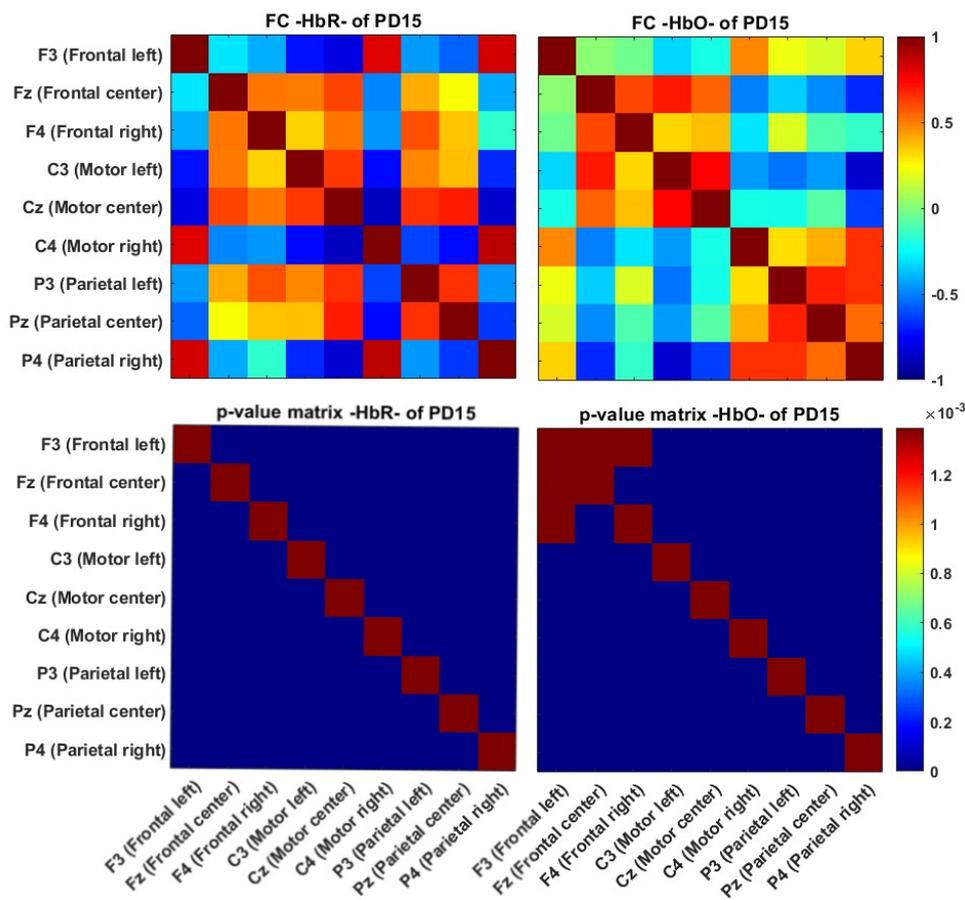


Figura 57: Matrici di FC (in alto). I p-value corretti con Bonferroni (in basso). Le rappresentazioni sono riferite a PD15.

Nelle Figure 54, 55, 56 e 57 vengono riportate anche le matrici che rappresentano i p-value nel range di significatività, corretto tramite Bonferroni, dove il blu indica un p-value estremamente basso corrispondente a una significatività statistica. Al contrario, i voxel rosso scuro indicano correlazioni non significative, poiché superiori alla correzione del livello di significatività alpha $1.4e-3$, pari a 0.05 diviso per il numero di confronti (36).

5.3 Risultati delle metriche del neurosviluppo

Nella sezione seguente verranno presentati i risultati ottenuti dai test eseguiti durante i follow-up ai 12 e 24 mesi di età corretta. Tale esposizione ha uno scopo puramente descrittivo per

fornire una panoramica dei risultati ottenuti. I grafici utilizzati sono a barre e rappresentano i valori medi per tutte le metriche con una barra d'errore rappresentante la deviazione standard. Si porta all'attenzione che l'*effetto gap* è riscontrabile in tutti i soggetti acquisiti, indicando che il disimpegno e lo spostamento dell'attenzione verso lo stimolo periferico nella condizione Overlap richiede tempi maggiori rispetto alla condizione Gap, in linea con quanto riportato in letteratura [115].

5.3.1 Risultati raccolti nel follow-up ai 12 mesi d'età corretta

In sequenza vengono presentati i valori delle metriche raccolte durante il follow-up a 12 mesi d'età corretta relativi ai seguenti test: *Gap-Overlap*, *Simultaneous Stream Change Detection Task* e i punteggi nelle scale Bayley III, rispettivamente in Figura 58, 59, 60.

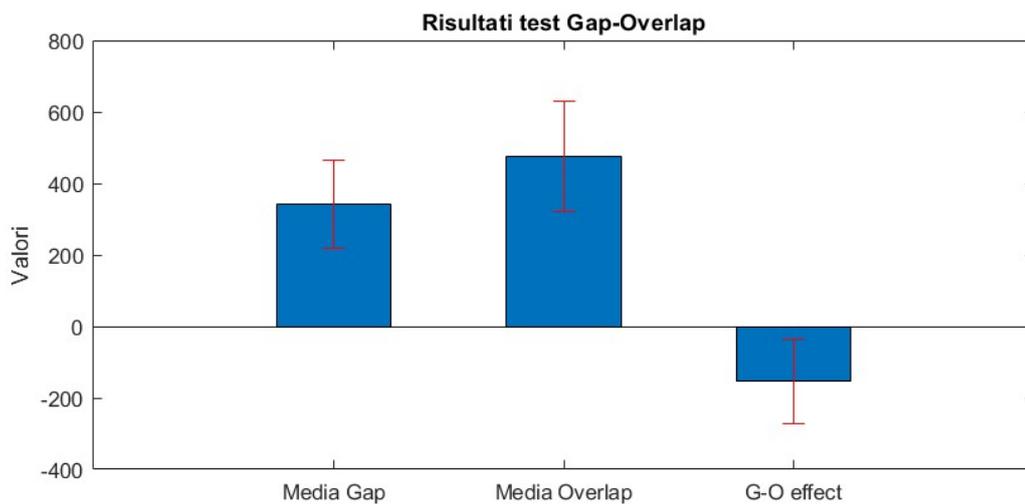


Figura 58: Risultati del test Gap-Overlap, da sinistra a destra: Media Gap, Media Overlap, effetto Gap-Overlap denominato anche effetto Gap; ai 12 mesi d'età corretta. Le barre riportano il valore medio e la deviazione standard per ogni metrica.

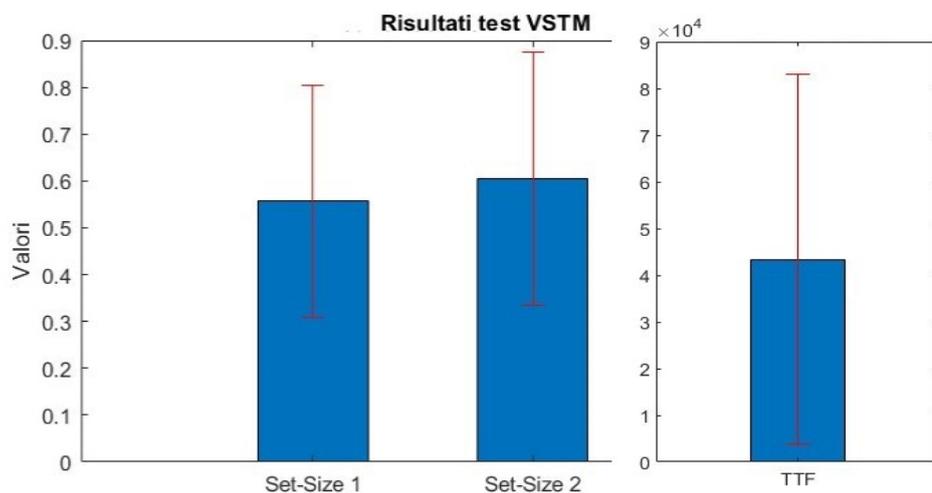


Figura 59: Risultati del test Simultaneous Stream Change Detection Task, da sinistra a destra: “Set Size 1”, “Set Size 2”, TTF (tempo totale di fissazione), ai 12 mesi d’età corretta. Le barre riportano il valore medio e la deviazione standard per ogni metrica.

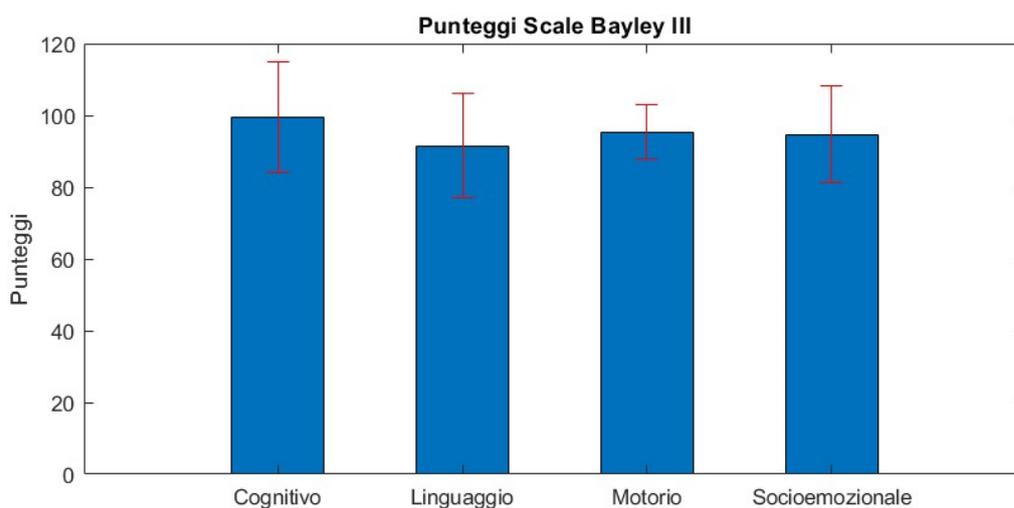


Figura 60: Risultati dei punteggi assegnati nelle scale Bayley III, da sinistra a destra si hanno i domini: cognitivo, linguistico, motorio, socioemozionale; ai 12 mesi d’età corretta. Le barre riportano il valore medio e la deviazione standard per ogni metrica.

Nei punteggi delle scale Bayley III è opportuno ricordare che il range di normalità è tra 85 e 115.

5.3.2 Risultati raccolti nel follow-up ai 24 mesi d'età corretta

In sequenza vengono presentati i valori delle metriche raccolte durante il follow-up a 24 mesi d'età corretta relativi ai seguenti test: *Gap-Overlap*, *Stream Change Detection Task* e i punteggi nelle scale Bayley III, rispettivamente in Figura 61, 62, 63.

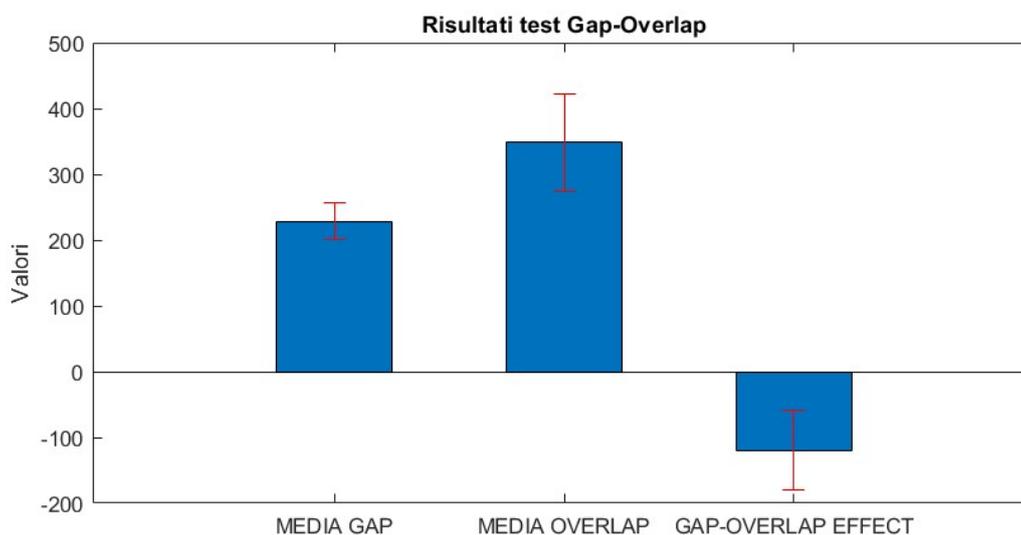


Figura 61: Risultati del test *Gap-Overlap*, da sinistra a destra: *Media Gap*, *Media Overlap*, *effetto Gap-Overlap* denominato anche *effetto Gap*; ai 24 mesi d'età corretta. Le barre riportano il valore medio e la deviazione standard per ogni metrica.

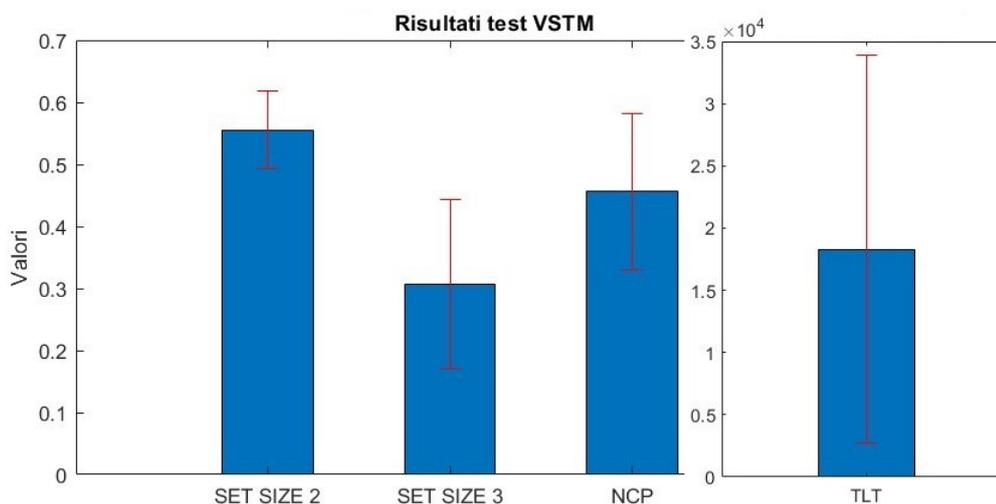


Figura 62: Risultati del test *Simultaneous Stream Change Detection Task*, da sinistra a destra: “*Set Size 1*”, “*Set Size 2*”, *TTF* (tempo totale di fissazione), *NCP* (indice di preferenza per lo stimolo fisso per il “*Set Size 3*”) ai 24 mesi d'età corretta. Le barre riportano il valore medio e la deviazione standard per ogni metrica.

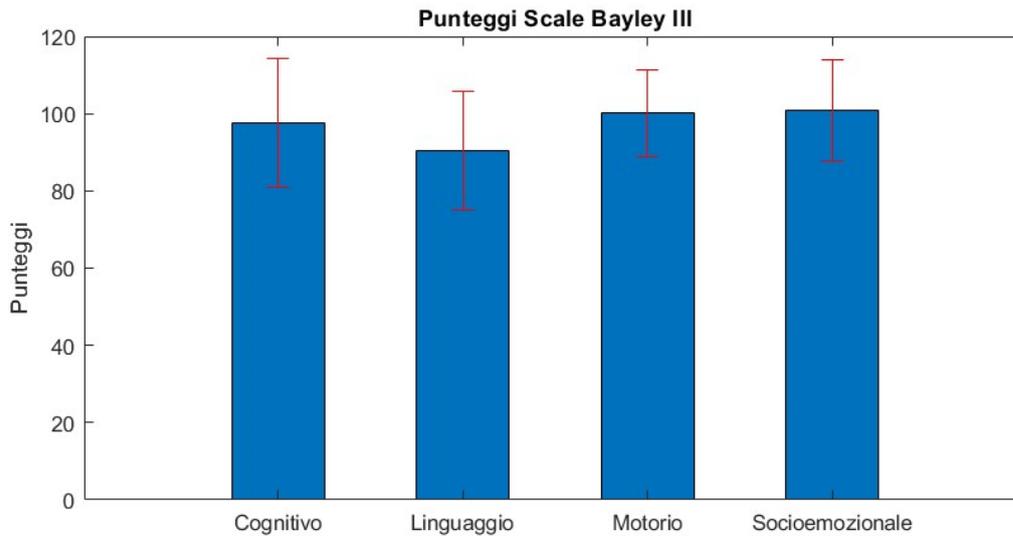


Figura 63: Risultati dei punteggi assegnati nelle scale Bayley III, da sinistra a destra si hanno i domini: cognitivo, linguistico, motorio, socioemozionale; ai 24 mesi d'età corretta. Le barre riportano il valore medio e la deviazione standard per ogni metrica.

Nei punteggi delle scale Bayley III è opportuno ricordare che il range di normalità è tra 85 e 115.

5.4 Risultati della correlazione tra le matrici di connettività funzionale e le metriche del neurosviluppo

In seguito, verranno riportati i risultati significativi dell'analisi esplorativa delle correlazioni tra le coppie di ROI e le metriche dello sviluppo, senza l'applicazione di una correzione per confronti multipli ai p-value.

5.4.1 Risultati per il follow-up a 12 mesi di età corretta

Ai 12 mesi d'età corretta tutte le variabili hanno presentano una distribuzione normale ed è stata eseguita la correlazione di Pearson con le coppie di ROI, ad eccezione dell'effetto Gap-Overlap e del tempo di fissazione totale per il paradigma di memoria, sulle quali è stata applicata la

correlazione di Spearman. I valori di r , riportati nelle figure dei risultati, rappresentano il coefficiente di correlazione, di Pearson o di Spearman a seconda delle casistiche, che misurano la forza e la direzione della relazione lineare tra le due variabili a confronto e può assumere un valore nel range $[-1, 1]$, dove -1 indica una correlazione negativa perfetta, 1 una correlazione positiva perfetta e 0 l'assenza di una correlazione.

5.4.1.1 Indici di sviluppo dell'attenzione

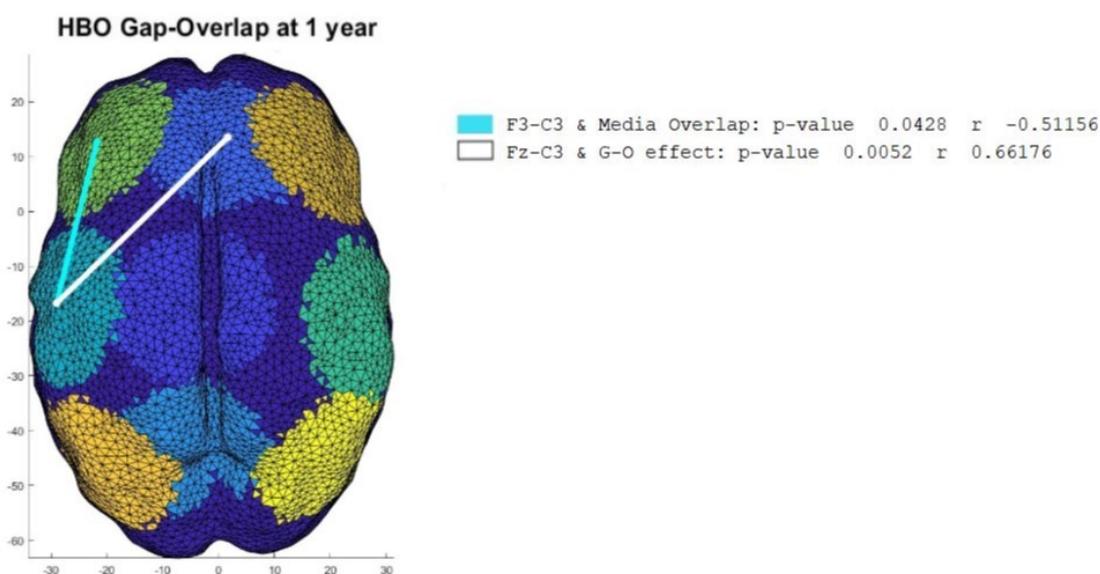


Figura 64: Risultati, ai 12 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbO e le metriche dello sviluppo per il paradigma sperimentale Gap-Overlap. La rappresentazione viene eseguita su un modello di testa riferito alle 30 settimane raffigurante le ROI. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica metrica dello sviluppo indicata dal colore della linea stessa: azzurre indicano la Media Overlap, quelle bianche l'effetto Gap-Overlap, mentre quelle rosse, anche se non presenti, la Media Gap.

Nelle correlazioni calcolate a 12 mesi d'età corretta, per il compito sperimentale Gap-Overlap e la matrice delle correlazioni riferita alle variazioni di HbO (vedi Figura 64), i risultati evidenziano due correlazioni significative, la prima negativa e la seconda positiva:

- tra la coppia di ROI F3-C3 e la media dei tempi saccadici nella condizione Overlap con un p-value di 0.0428;

- tra la coppia di ROI Fz-C3 e l'effetto Gap-Overlap con un p-value di 0.0052.

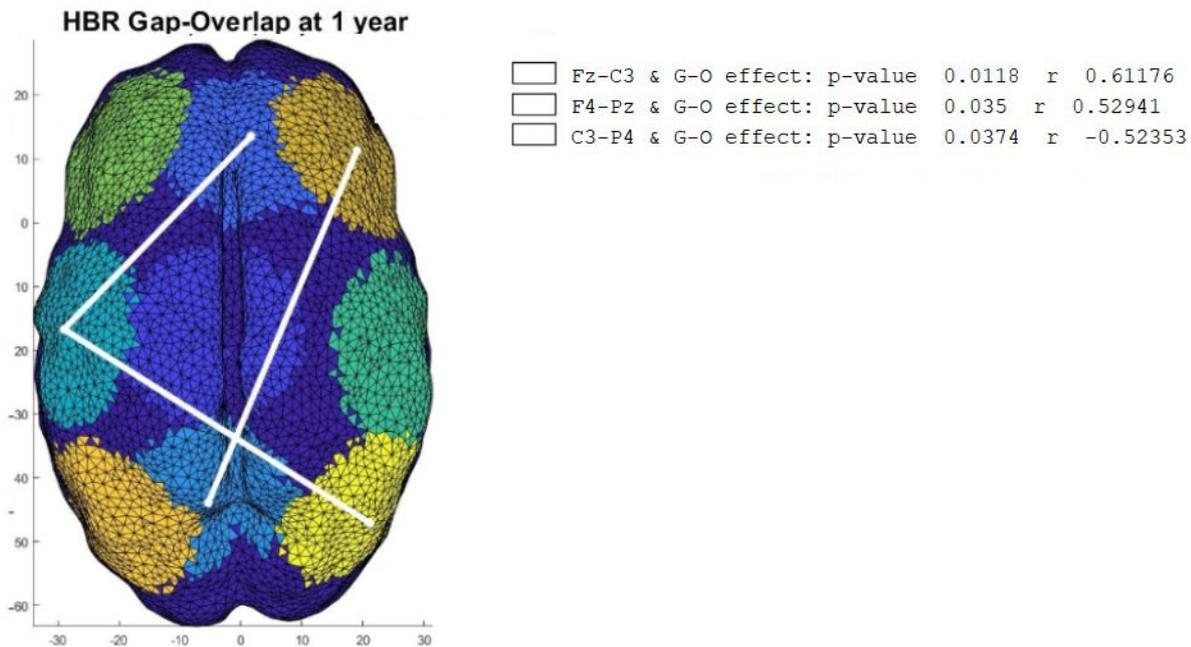


Figura 65: Risultati, ai 12 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbR e le metriche dello sviluppo per il paradigma sperimentale Gap-Overlap. La rappresentazione viene eseguita su un modello di testa riferito alle 30 settimane raffigurante le ROI. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica metrica dello sviluppo indicata dal colore della linea stessa: bianche indicano l'effetto Gap-Overlap, mentre quelle azzurre indicano la Media Overlap e quelle rosse la Media Gap, anche se non presenti.

Nel caso di HbR (vedi Figura 65) sono presenti tre correlazioni significative:

- tra la coppia di ROI Fz-C3 e l'effetto *Gap-Overlap* con un p-value di 0.0118;
 - tra la coppia di ROI F4-Pz e l'effetto *Gap-Overlap* con un p-value di 0.035;
 - tra la coppia di ROI F4-Pz e l'effetto *Gap-Overlap* con un p-value di 0.035;
- le prime due sono positive, mentre l'ultima è negativa.

Nessuno dei precedenti test presenta un p-value sufficientemente basso per risultare significativo anche in caso di correzione per confronti multipli.

5.4.1.2 Indici di sviluppo della memoria

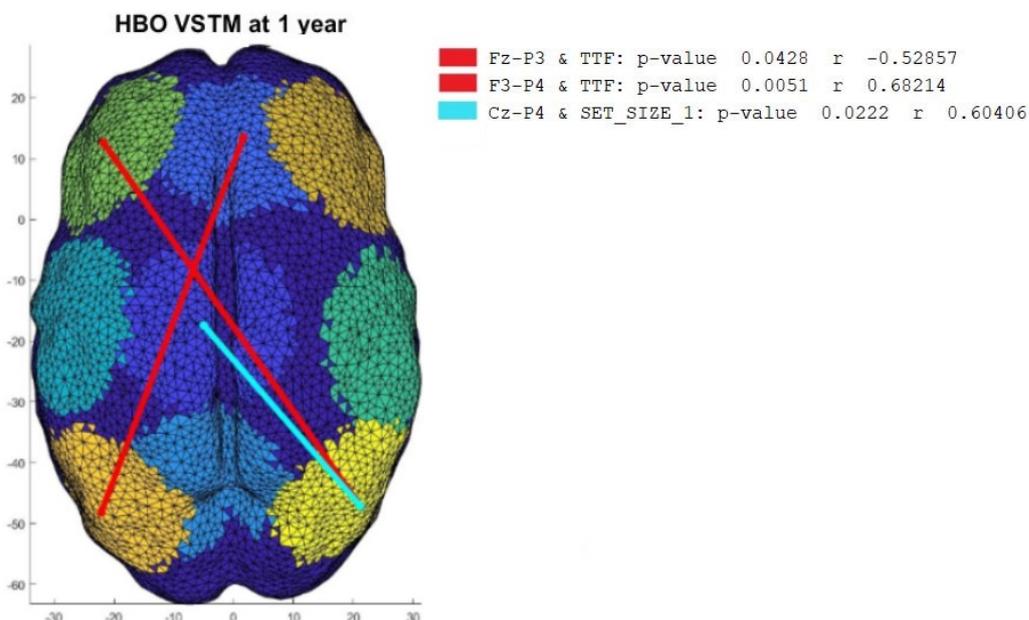


Figura 66: Risultati, ai 12 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbO e le metriche dello sviluppo relative al compito di memoria visiva. La rappresentazione viene eseguita su un modello di testa riferito alle 30 settimane raffigurante le ROI. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica metrica dello sviluppo indicata dal colore della linea stessa: azzurre indicano il "Set Size 1" e quelle rosse il tempo di fissazione totale, mentre quelle bianche il "Set Size 2" anche se non presenti.

Nelle correlazioni calcolate a 12 mesi d'età corretta, per il compito sperimentale *Simultaneous Stream Change Detection Task*, che valutava la capacità di memoria, e la matrice delle correlazioni riferita alle variazioni di HbO (vedi Figura 66), i risultati individuano tre correlazioni:

- tra la coppia di ROI Fz-P3 e il tempo totale di fissazione con un p-value di 0.0428;
- tra la coppia di ROI F3-P4 e il tempo totale di fissazione con un p-value di 0.0051;
- tra la coppia di ROI Cz-P4 e l'indice di preferenza al cambiamento per "Set Size 1" con un p-value di 0.0222;

la prima è negativa, mentre le ultime due sono positive.

Nel caso di HbR (vedi Figura 67) viene individuata una correlazione positiva tra la coppia di ROI P3-P4 e il tempo totale di fissazione con un p-value di 0.0179.

Nessuno dei precedenti test presenta un p-value sufficientemente basso per risultare significativo anche in caso di correzione per confronti multipli.

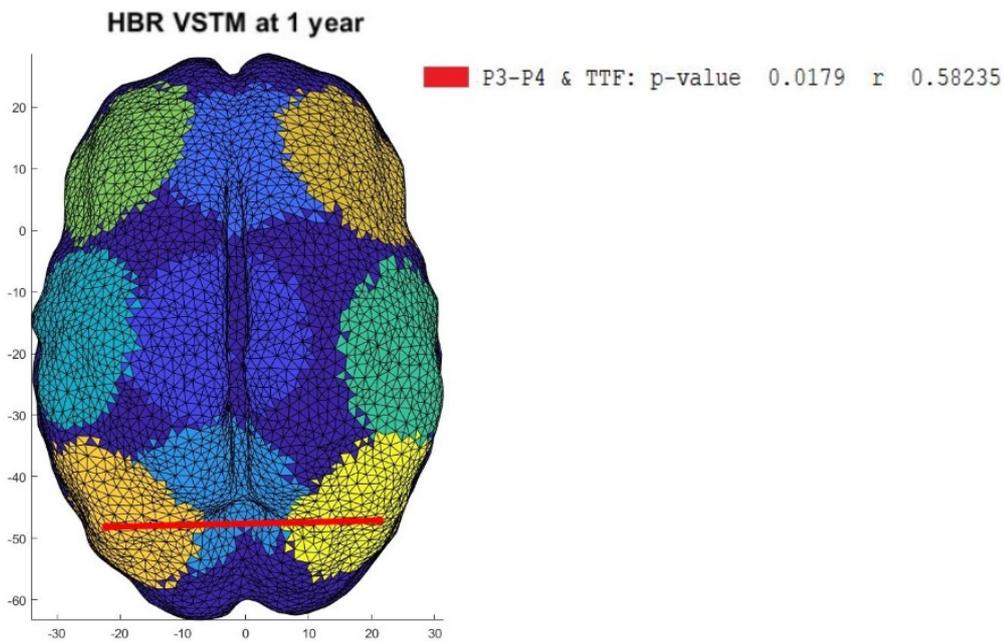


Figura 67 Risultati, ai 12 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbR e le metriche dello sviluppo relative al compito di memoria visiva. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica metrica dello sviluppo indicata dal colore della linea stessa: rosse il tempo di fissazione totale, mentre quelle bianche il "Set Size 2" e azzurre indicano il "Set Size 1", anche se non presenti.

5.4.1.3 Indici di sviluppo cognitivo, motorio, linguistico e socio-emozionale

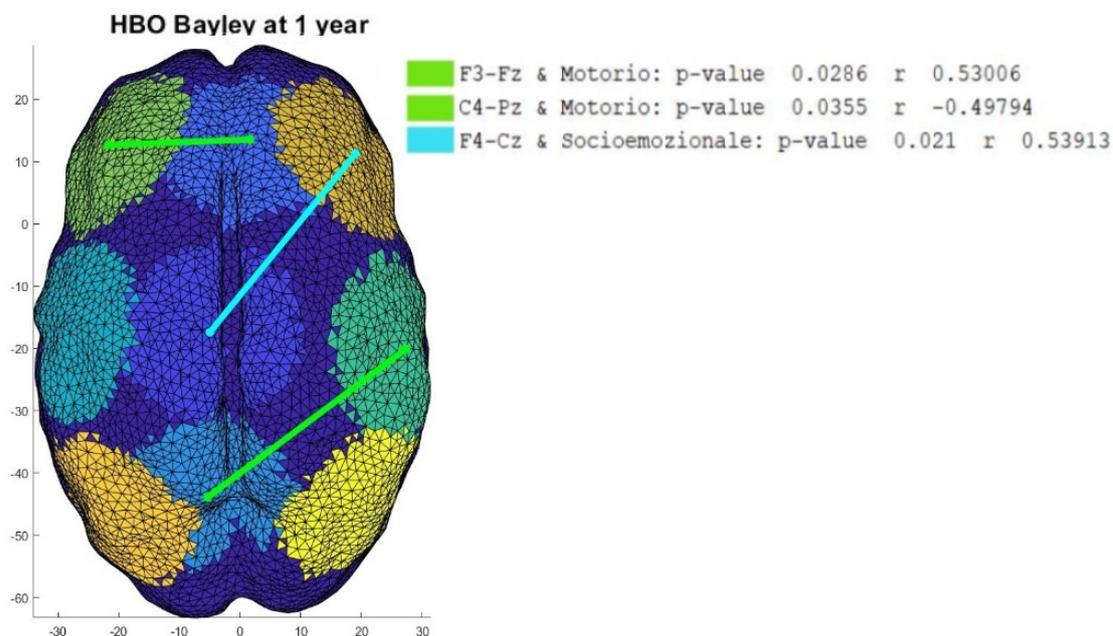


Figura 68: Risultati, ai 12 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbO e le metriche della scala Bayley. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica metrica dello sviluppo indicata dal colore della linea stessa: rosso linguaggio, bianco cognitivo, azzurro socio-emozionale e verde motorio.

Nelle correlazioni calcolate a 12 mesi d'età corretta, per le valutazioni eseguite con le scale Bayley III e la matrice delle correlazioni riferita alle variazioni di HbO (vedi Figura 68), i risultati individuano tre correlazioni:

- correlazione positiva tra la coppia di ROI F3-Fz e la sottoscala motoria con un p-value di 0.0286;
- correlazione negativa tra la coppia di ROI C4-Pz e la sottoscala motoria con un p-value di 0.0355;
- correlazione positiva tra la coppia di ROI F4-Cz e la sottoscala socio-emozionale con un p-value di 0.021.

Nel caso di HbR (vedi Figura 69) sono presenti tre correlazioni significative positive:

- tra la coppia di ROI F3-F4 e la sottoscala cognitiva con un p-value di 0.0487;
- tra la coppia di ROI C3-P3 e la sottoscala linguaggio con un p-value di 0.0483;
- tra la coppia di ROI F4-P4 e la sottoscala socio-emozionale con un p-value di 0.0489.

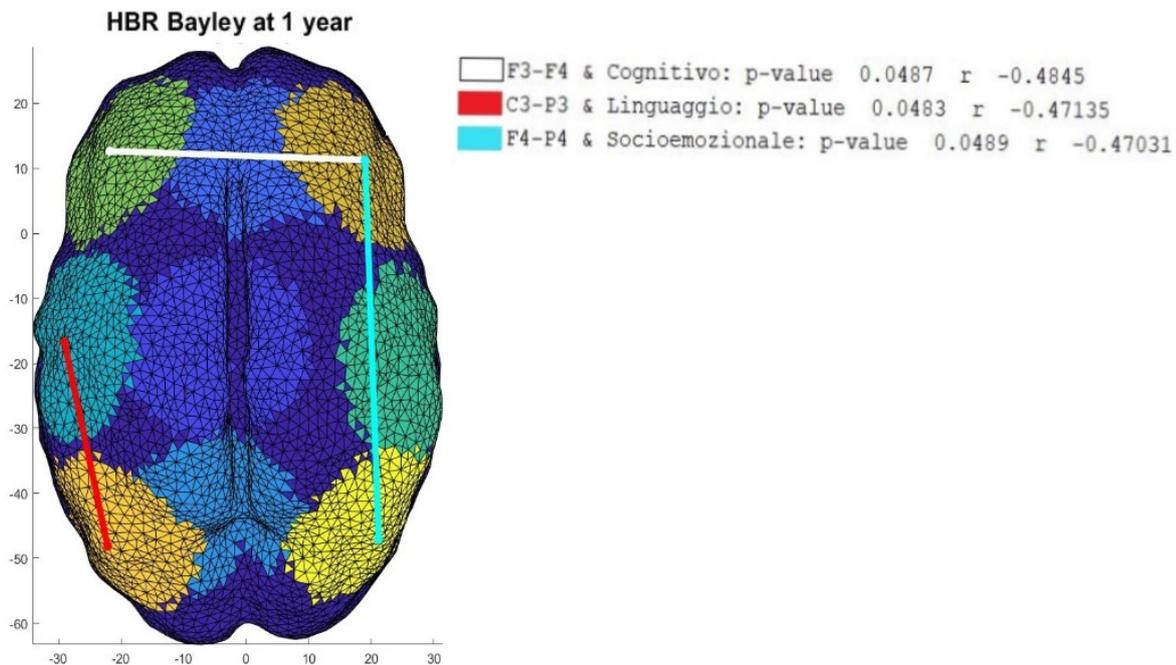


Figura 69: Risultati, ai 12 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbR e le metriche della scala Bayley. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica metrica dello sviluppo indicata dal colore della linea stessa: rosso linguaggio, bianco cognitivo, azzurro socio-emozionale e verde motorio.

Nessuno dei precedenti test presenta un p-value sufficientemente basso per risultare significativo anche in caso di correzione per confronti multipli.

5.4.1.4 Risultati delle correlazioni a gruppi

Nel test non parametrico di Kruskal-Wallis, ai 12 mesi d'età corretta, sono stati considerati 3 gruppi (la cui numerosità viene riportata nella Figura 70) a seconda dei punteggi realizzati nelle singole sottoscale delle Scale Bayley III per ogni bambino: normale [85-115], sopra la normalità [>115] e al di sotto della normalità [< 85]. È importante notare che, nel caso del dominio

motorio, tutti i bambini riportano una valutazione nella norma, per tanto non è possibile procedere con il calcolo del test statistico. Per i 3 domini rimanenti è stata valutata l'eventuale esistenza di differenze significative tra i gruppi nei coefficienti delle matrici FC considerati separatamente per ogni coppia di ROI.

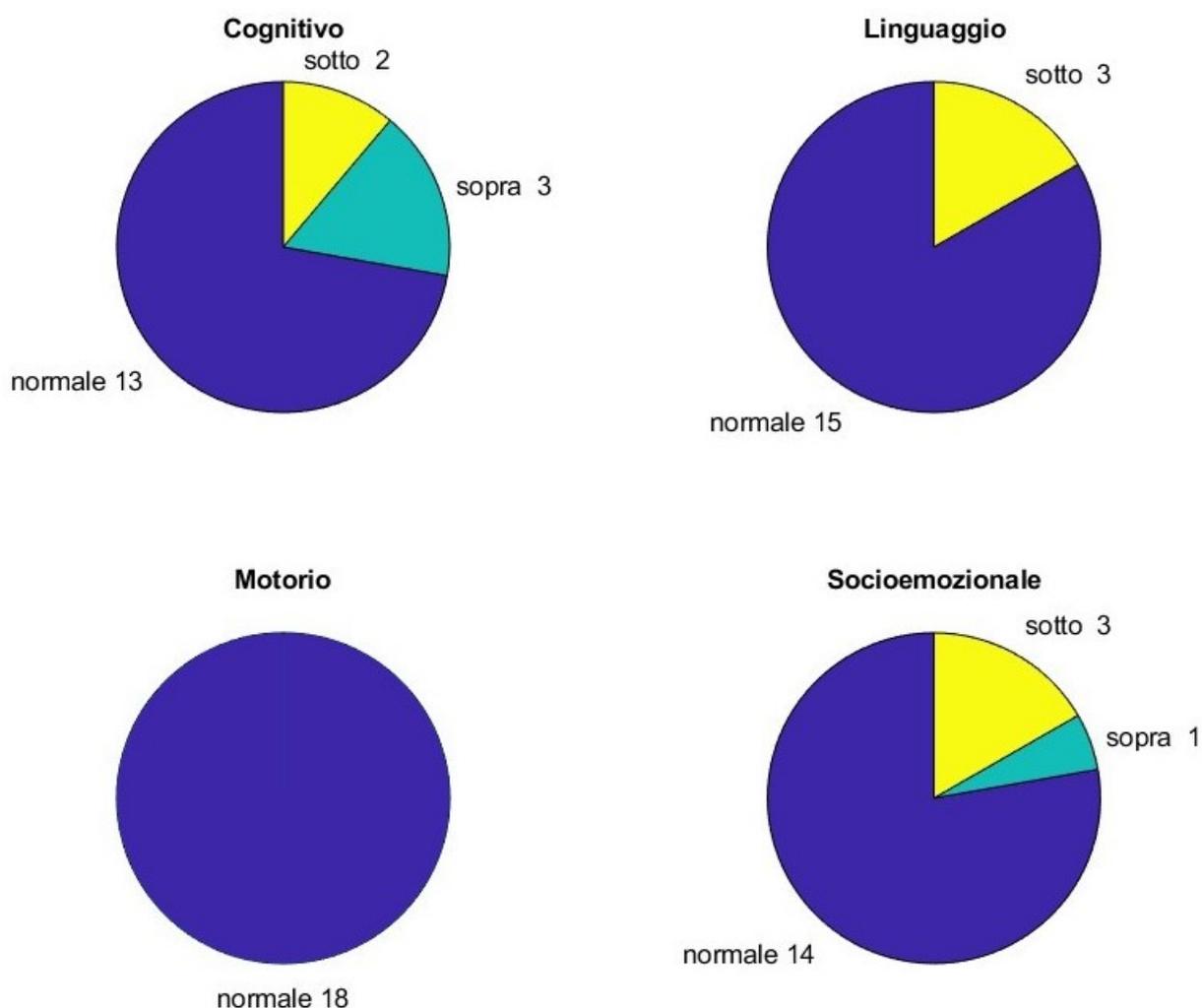


Figura 70: Divisione della popolazione nei gruppi: normale con punteggi tra 85 e 115, sopra se maggiori di 115 e sotto se inferiori a 85, con la numerosità a lato. Vengono riportati per ogni sottoscala, ai 12 mesi d'età corretta.

I risultati significativi individuati sono riportati di seguito, nella Figura 71 e 72. Nel caso di HbO, risulta che i gruppi sono statisticamente differenti per quattro confronti:

- la coppia P3-P4 nel dominio del linguaggio con un p-value di 0.029; in questo dominio i gruppi a confronto sono due e per tanto, i bambini presentano ranghi medi tra il gruppo normale e sotto-normale statisticamente differenti in questa correlazione tra ROI;
- la coppia F4-Cz nel dominio socio-emozionale, con un p-value di 0.029; nello specifico i gruppi sotto-normalità e normalità presentano ranghi medi statisticamente differenti con un p-value di 0.026784;
- la coppia F4-P3 nel dominio socio-emozionale, con un p-value di 0.049; nessuno dei confronti a coppie tra i 3 gruppi è risultato statisticamente significativo (non riportato in Figura 71 per questo motivo);
- la coppia F4-P4 nel dominio socio-emozionale, con un p-value di 0.021; la media dei ranghi tra il gruppo normale e sotto-normale è risultato statisticamente significativo con un p-value di 0.019.

Per quanto riguarda HbR, l'unica coppia ROI per la quale i gruppi risultano statisticamente differenti è per il linguaggio nelle ROI Pz-P3 ed essendo solo due i gruppi a confronto questi sono statisticamente differenti.

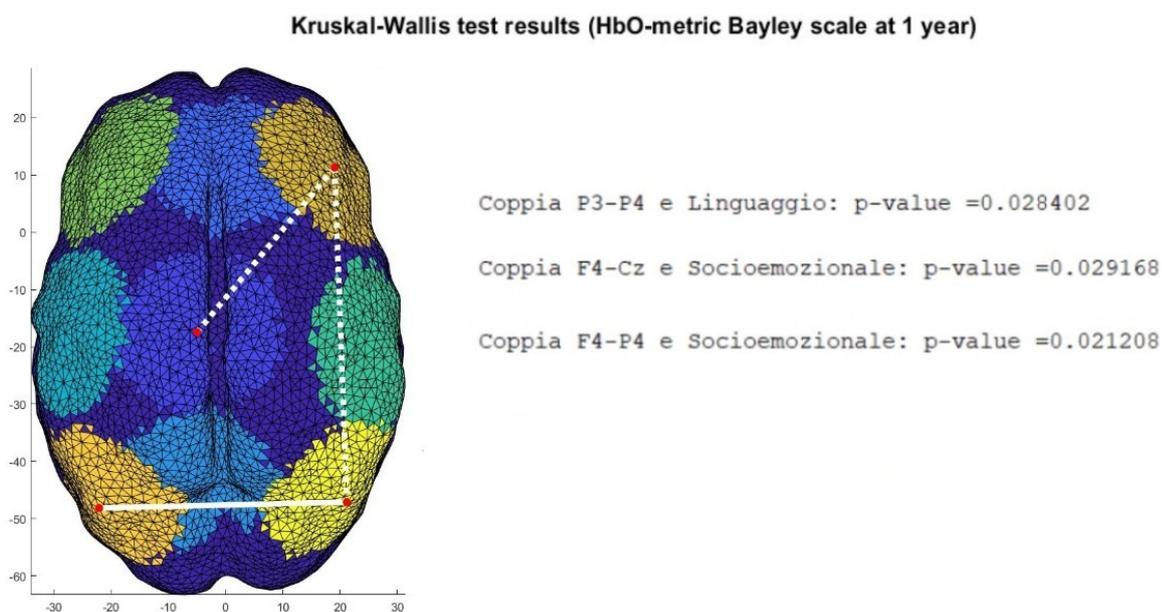


Figura 71: Risultati del test di Kruskal-Wallis per HbO divisi in gruppi sulla base dei punteggi nelle scale Bayley III dei bambini ai 12 mesi di età corretta. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica sottoscala dello sviluppo indicata dallo stile della linea stessa: continua linguaggio, tratteggiata socio-emozionale.

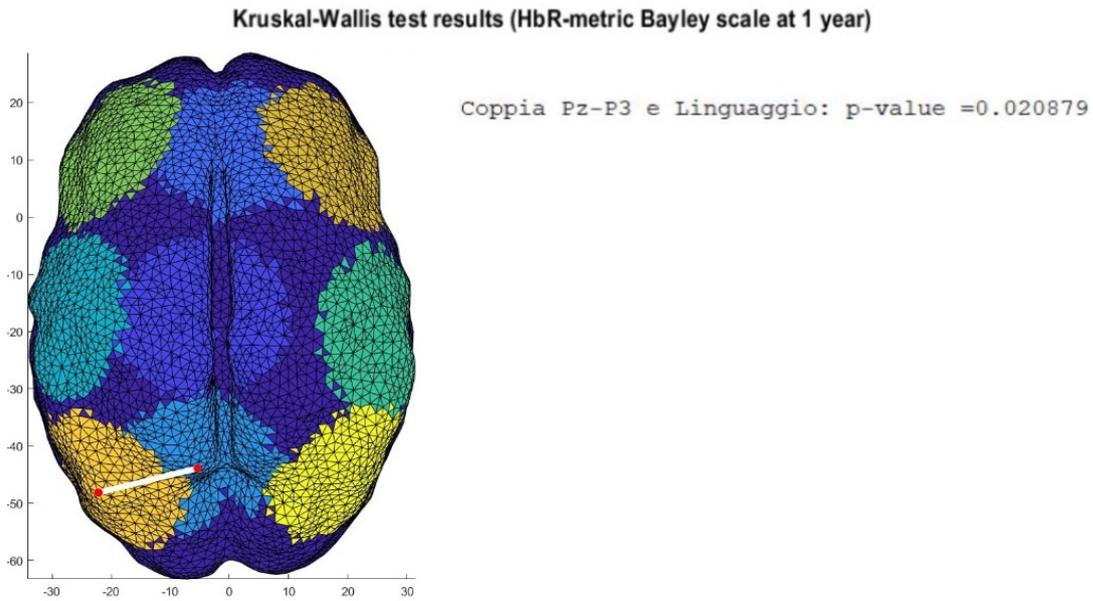


Figura 72: Risultati del test di Kruskal-Wallis per HbR divisi in gruppi sulla base dei punteggi nelle scale Bayley III dei bambini ai 12 mesi di età corretta. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica sottoscala dello sviluppo indicata dallo stile della linea stessa: continua linguaggio.

5.4.2 Risultati per il follow-up a 24 mesi di età corretta

Ai 24 mesi d'età corretta tutte le variabili presentano una distribuzione normale ed è stata eseguita la correlazione di Pearson con le coppie di ROI; mentre nel caso dei confronti con i punteggi ottenuti nelle sottoscale Bayley III viene sempre applicata la correlazione di Spearman.

5.4.2.1 Indici di sviluppo dell'attenzione

Nelle correlazioni calcolate per il compito sperimentale *Gap-Overlap* e la matrice delle correlazioni riferita alle variazioni di HbO (vedi Figura 73), i risultati individuano cinque correlazioni, la prime quattro negative e l'ultima positiva:

- tra la coppia di ROI Cz-C4 e la latenza saccadica media per la condizione *Gap*, con un p-value di 0.0472;

- tra la coppia di ROI Cz-P4 e la latenza saccadica media per la condizione *Gap*, con un p-value di 0.0256;
- tra la coppia di ROI F4-C3 e la latenza saccadica media per la condizione *Overlap*, con un p-value di 0.0392;
- tra la coppia di ROI Pz-P3 e la latenza saccadica media per la condizione *Overlap*, con un p-value di 0.0185;
- tra la coppia di ROI Pz-P3 e l'effetto *Gap-Overlap*, con un p-value di 0.0081.

Nel caso di HbR (vedi Figura 74) sono presenti due correlazioni significative:

- tra la coppia di ROI Cz-P4 e la latenza saccadica media per la condizione *Gap*, con un p-value di 0.0172;
- tra la coppia di ROI P3-P4 e l'effetto *Gap-Overlap*, con un p-value di 0.0294.

la prima è negativa, mentre la seconda è positiva.

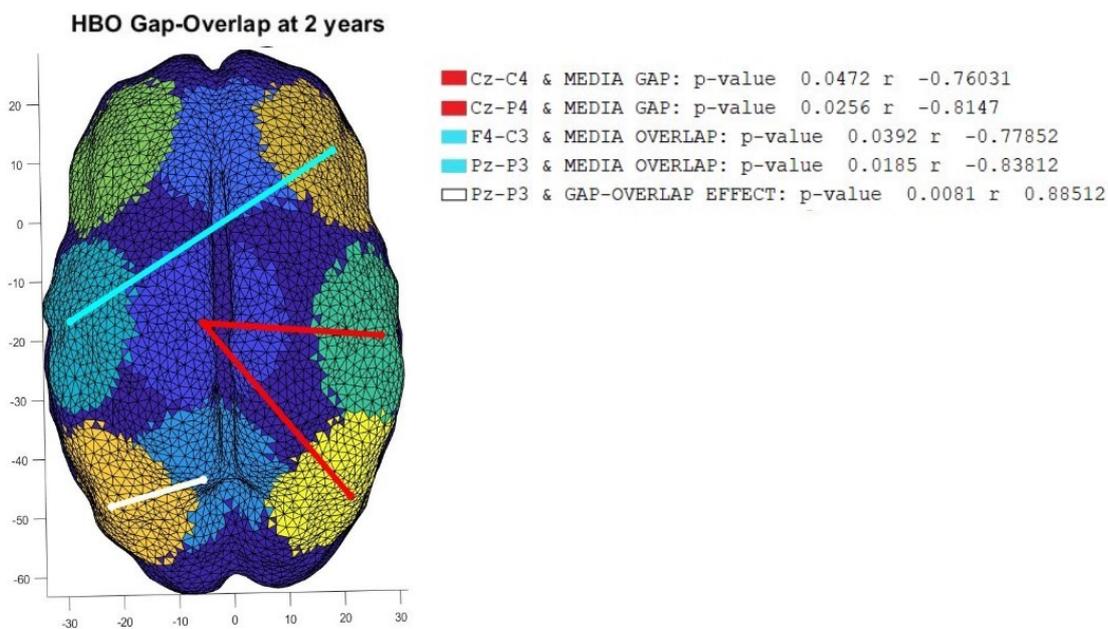


Figura 73: Risultati, ai 24 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbO e le metriche dello sviluppo per il paradigma sperimentale Gap-Overlap. La rappresentazione viene eseguita su un modello di testa riferito alle 30 settimane raffigurante le ROI, le linee azzurre indicano la Media Overlap, quelle bianche l'effetto Gap-Overlap e quelle rosse la Media Gap.

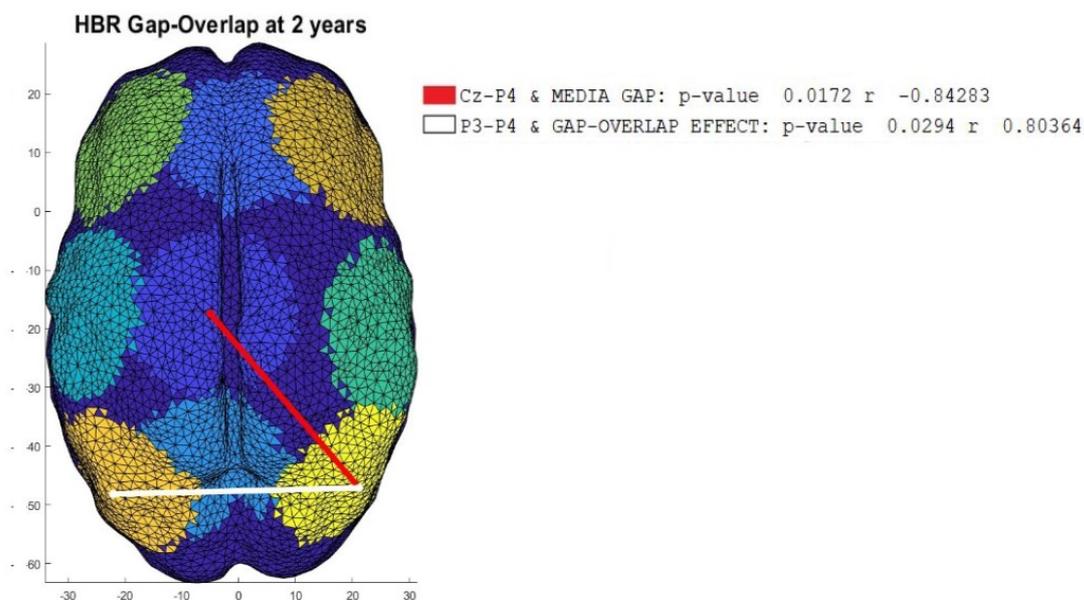


Figura 74: Risultati, ai 24 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbR e le metriche dello sviluppo per il paradigma sperimentale Gap-Overlap. La rappresentazione viene eseguita su un modello di testa riferito alle 30 settimane raffigurante le ROI, le linee bianche si riferiscono all'effetto Gap-Overlap e quelle rosse la Media Gap.

5.4.2.2 Indici di sviluppo della memoria

Nelle correlazioni calcolate a 24 mesi d'età corretta, per il compito sperimentale *Simultaneous Stream Change Detection Task*, che valuta la capacità di memoria visiva, e la matrice delle correlazioni riferita alle variazioni di HbO (vedi Figura 75), i risultati individuano cinque correlazioni significative:

- tra la coppia di ROI F3-Fz e l'indice di preferenza al cambiamento per "Set Size 3" con un p-value di 0.0104;
- tra la coppia di ROI Fz-C3 e l'indice di preferenza al cambiamento per "Set Size 3" con un p-value di 0.0184;
- tra la coppia di ROI F3-C4 e l'indice di preferenza al cambiamento per "Set Size 3" con un p-value di 0.0137;
- tra la coppia di ROI Fz-C4 e l'indice di preferenza al cambiamento per "Set Size 3" con un p-value di 0.0169;

- tra la coppia di ROI F4-C4 e l'indice di preferenza per lo stimolo fisso per il "Set Size 3" (NCP) per "Set Size 3" con un p-value di 0.0094;

le prime due e l'ultima sono positive, mentre la terza e la quarta sono negative.

Nel caso di HbR (vedi Figura 76) vengono individuate 15 correlazioni significative:

- tra la coppia F3-Fz e l'indice di preferenza al cambiamento per il "Set Size 3": p-value=0.0113, $r=0.95525$;
- tra la coppia Fz-C3 e l'indice di preferenza al cambiamento per il "Set Size 3": p-value=0.0112, $r=0.95558$;
- tra la coppia F3-Cz e l'indice di preferenza al cambiamento per il "Set Size 3": p-value=0.011, $r=0.95596$;
- tra la coppia Fz-Cz e l'indice di preferenza al cambiamento per il "Set Size 3": p-value=0.0061, $r=0.9702$;
- tra la coppia F4-Cz e l'indice di preferenza al cambiamento per il "Set Size 3": p-value=0.005, $r=0.94182$;
- tra la coppia C3-Cz e l'indice di preferenza al cambiamento per il "Set Size 3": p-value=0.0174, $r=0.89036$;
- tra la coppia Fz-C4 e l'indice di preferenza al cambiamento per il "Set Size 3": p-value=0.0075, $r=-0.9661$;
- tra la coppia F4-Pz e l'indice di preferenza al cambiamento per il "Set Size 3": p-value=0.0227, $r=0.87436$;
- tra la coppia F3-P4 e l'indice di preferenza al cambiamento per il "Set Size 3": p-value=0.0092, $r=-0.96101$;
- tra la coppia Fz-P4 e l'indice di preferenza al cambiamento per il "Set Size 3": p-value=0.0035, $r=-0.97955$;
- tra la coppia C3-Cz e il tempo totale di fissazione (TLT): p-value=0.0346, $r=0.7898$;
- tra la coppia Fz-P3 e il tempo totale di fissazione (TLT): p-value=0.0059, $r=0.93653$;
- tra la coppia F3-Pz e il tempo totale di fissazione (TLT): p-value=0.0349, $r=0.8433$;
- tra la coppia Fz-Pz e il tempo totale di fissazione (TLT): p-value=0.0293, $r=0.85669$;
- tra la coppia P3-P4 e il tempo totale di fissazione (TLT): p-value=0.0378, $r=-0.7819$.

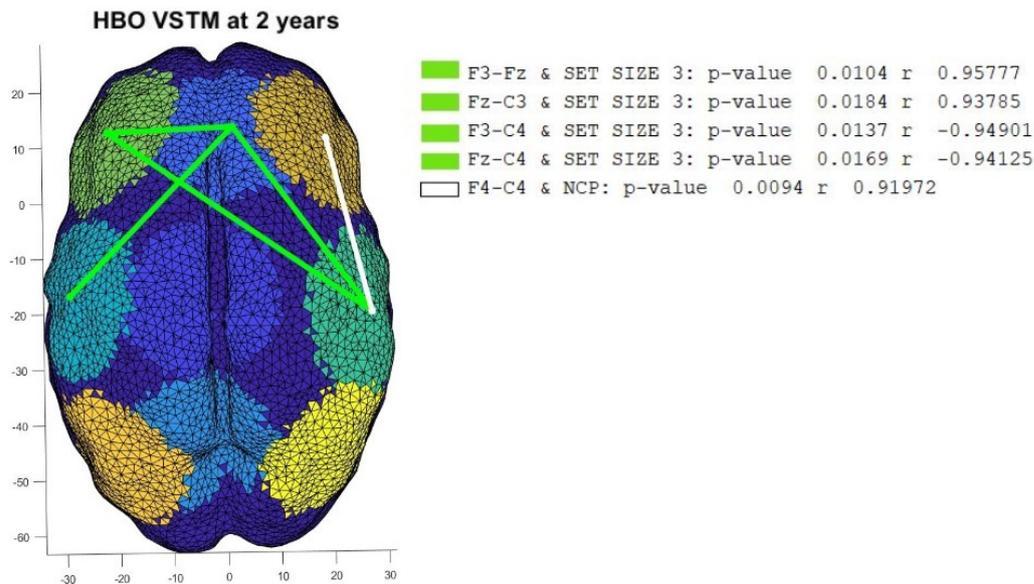


Figura 75: Risultati, ai 24 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbO e le metriche dello sviluppo relative al compito di memoria visiva. La rappresentazione viene eseguita su un modello di testa riferito alle 30 settimane raffigurante le ROI. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica metrica dello sviluppo indicata dal colore della linea stessa: verdi indicano la preferenza al cambiamento per il "Set Size 3" e quelle bianche la preferenza per lo stimolo fisso per il "Set Size 3".

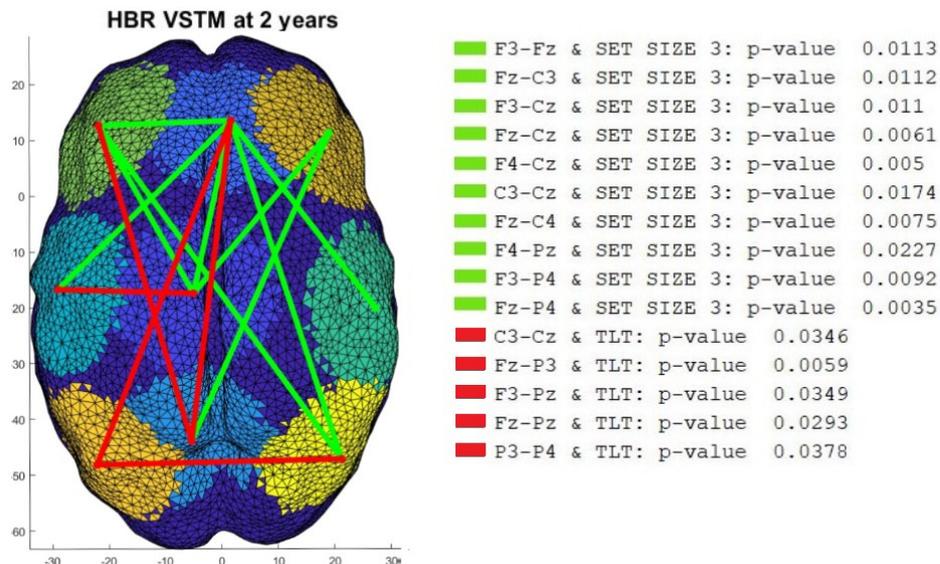


Figura 76: Risultati, ai 24 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbR e le metriche dello sviluppo relative al compito di memoria visiva. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica

metrica dello sviluppo indicata dal colore della linea stessa: verdi indicano il “Set Size 3” e quelle rosse il tempo totale di fissazione.

5.4.2.3 Indici di sviluppo cognitivo, motorio, linguistico e socio-emozionale

Nelle correlazioni calcolate a 24 mesi d'età corretta, per le valutazioni eseguite con le scale Bayley III e la matrice delle correlazioni riferita alle variazioni di HbO (vedi Figura 77), i risultati individuano quattro correlazioni negative:

- correlazione tra la coppia di ROI F4-P3 e la sottoscala del linguaggio, con un p-value di 0.0166;
- correlazione tra la coppia di ROI F4-Pz e la sottoscala del linguaggio, con un p-value di 0.0345;
- correlazione tra la coppia di ROI C3-C4 e la sottoscala motoria, con un p-value di 0.0396;
- correlazione tra la coppia di ROI F3-P4 e la sottoscala motoria, con un p-value di 0.0051.

Nel caso di HbR (vedi Figura 78) sono presenti quattro correlazioni significative:

- correlazione positiva tra la coppia di ROI F3-Pz e la sottoscala motoria, con un p-value di 0.0345;
- correlazione positiva tra la coppia di ROI Fz-Pz e la sottoscala motoria, con un p-value di 0.0116;
- correlazione negativa tra la coppia di ROI F3-P4 e la sottoscala motoria, con un p-value di 0.0226;
- correlazione positiva tra la coppia di ROI Fz-Cz e la sottoscala socio-emozionale, con un p-value di 0.0409.

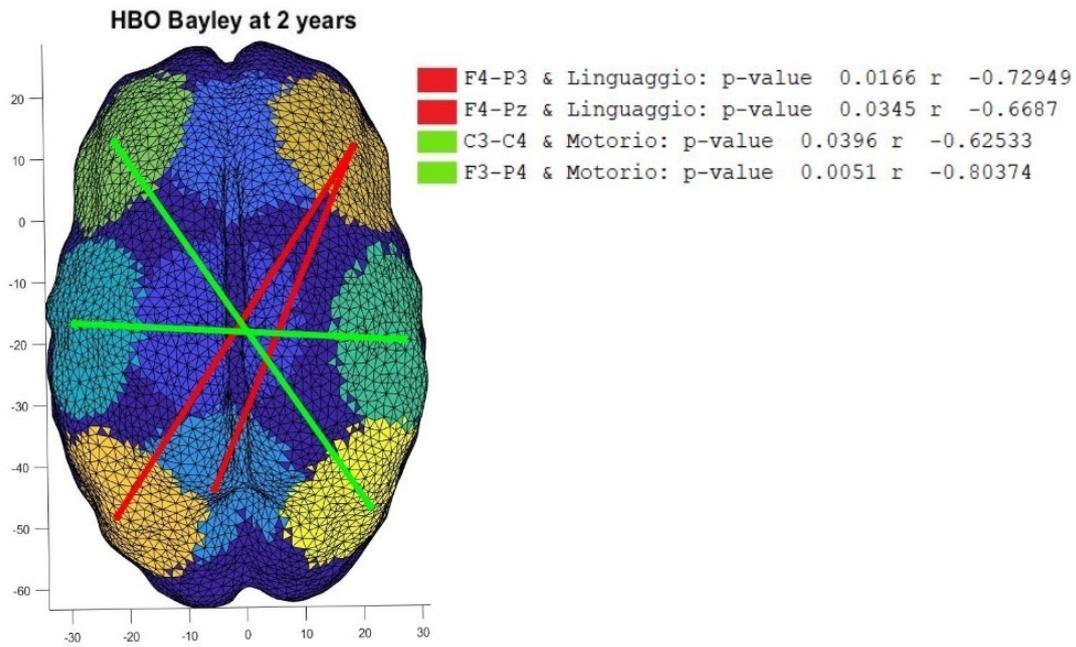


Figura 77: Risultati, ai 24 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbO e le metriche della scala Bayley. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica metrica dello sviluppo indicata dal colore della linea stessa: rosso linguaggio, bianco cognitivo, azzurro socio-emozionale e verde motorio.

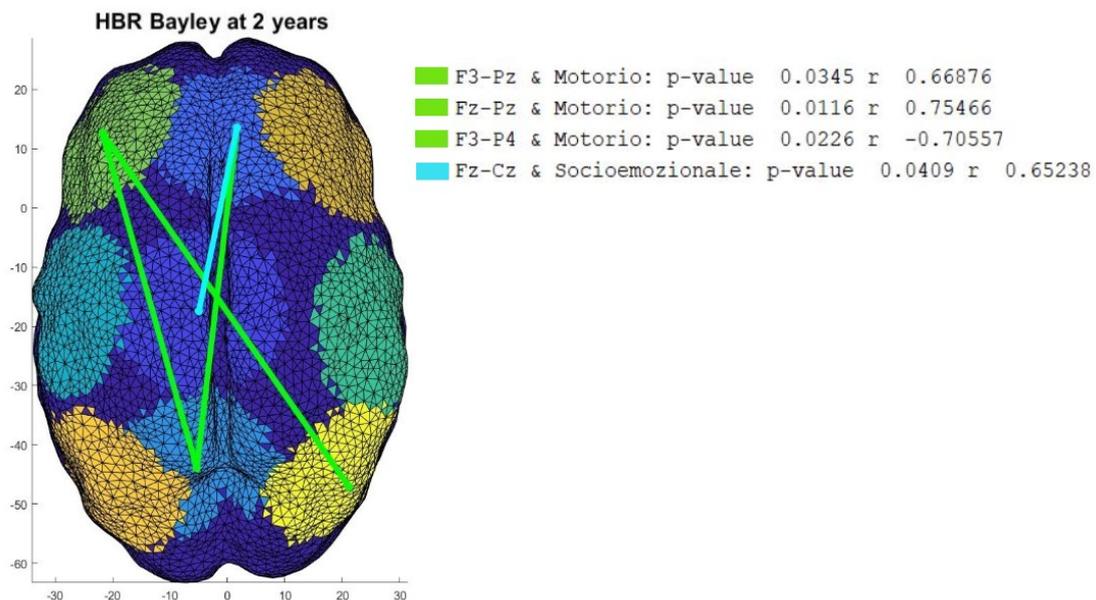


Figura 78: Risultati, ai 24 mesi d'età corretta, relativi alle correlazioni tra le coppie di ROI riferite a HbR e le metriche della scala Bayley. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica metrica dello sviluppo indicata dal colore della linea stessa: rosso linguaggio, bianco cognitivo, azzurro socio-emozionale e verde motorio.

Nessuno dei precedenti test presenta un p-value sufficientemente basso per risultare significativo anche in caso di correzione per confronti multipli

5.4.2.4 Risultati delle correlazioni a gruppi

Nel test non parametrico di Kruskal-Wallis ai 24 mesi d'età la numerosità dei collettivi viene riportata nella Figura 79 e per tutti i 4 domini è stata valutata l'eventuale esistenza di differenze significative tra i gruppi nei coefficienti delle matrici FC, considerati separatamente per ogni coppia di ROI.

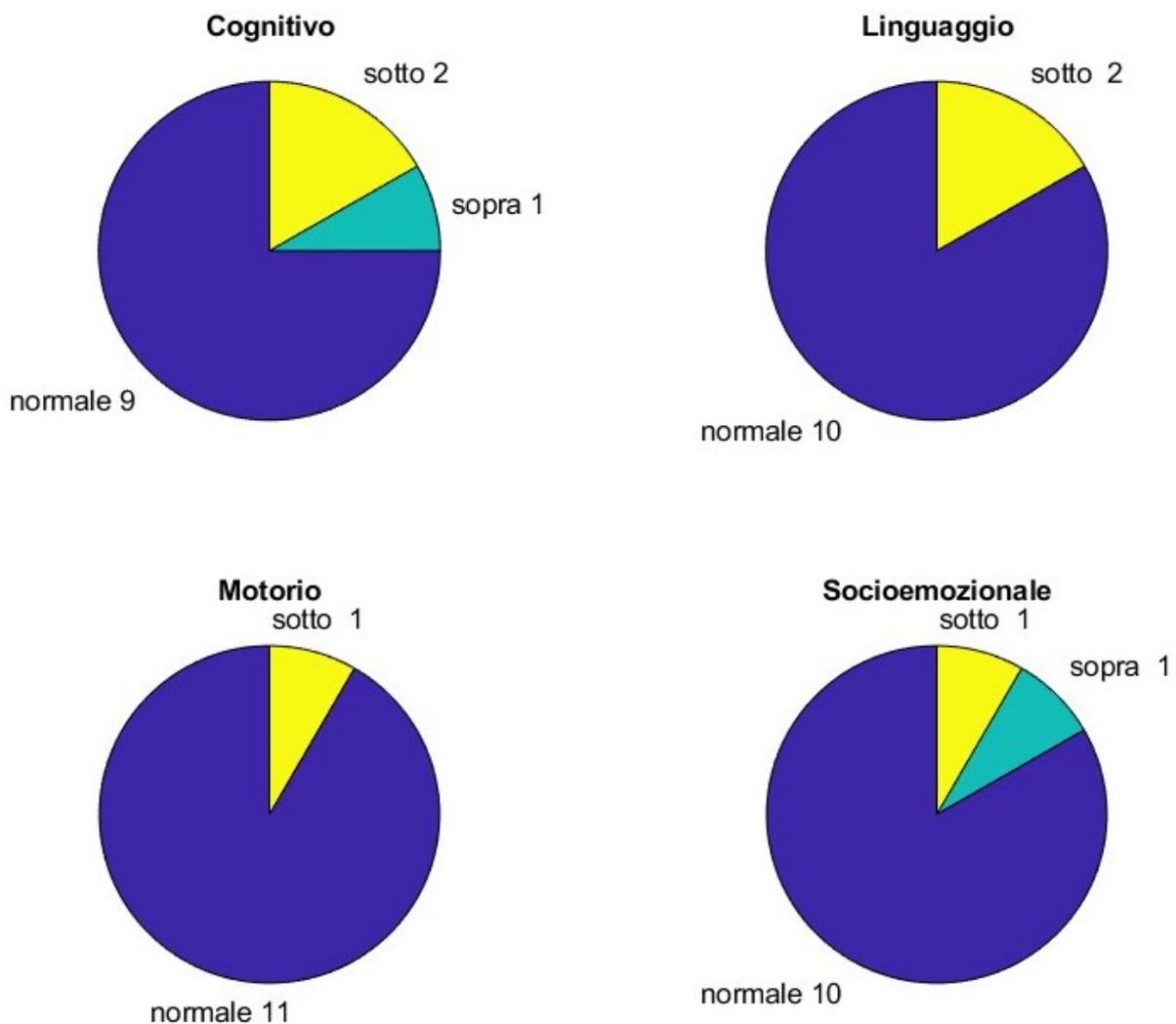


Figura 79: Divisione della popolazione nei gruppi: normale con punteggi tra 85 e 115, sopra se maggiori di 115 e sotto se inferiori a 85, con la numerosità a lato. Vengono riportati per ogni sottoscala in riferimento ai 24 mesi d'età corretta.

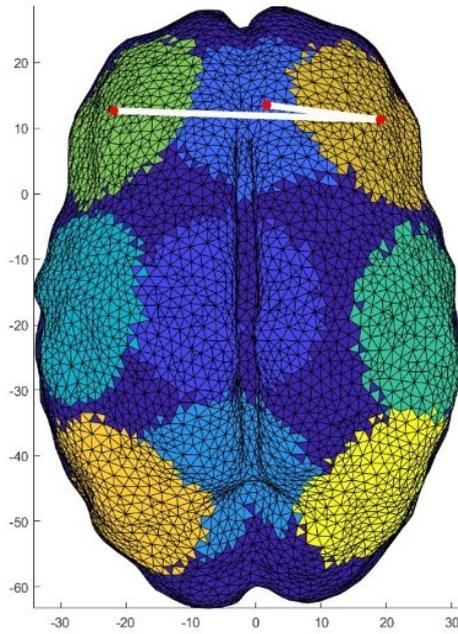
I risultati significativi individuati sono riportati di seguito, nella Figura 80 e 81. Nel caso di HbO, risulta che i gruppi siano statisticamente differenti per quattro confronti:

- la coppia C3-Cz nel dominio del cognitivo, con un p-value di 0.044; nessuno dei confronti a coppie tra i 3 gruppi è risultato statisticamente significativo (non riportato in Figura 80);
- la coppia F3-P3 nel dominio del cognitivo, con un p-value di 0.049; nessuno dei confronti a coppie tra i 3 gruppi è risultato statisticamente significativo (non riportato in Figura 80);
- la coppia F3-F4 nel dominio del linguaggio, con un p-value di 0.034; nello specifico i gruppi sotto-normalità e normalità presentano ranghi medi statisticamente differenti con lo stesso p-value;
- la coppia Fz-F4 nel dominio del linguaggio, con un p-value di 0.034; la media dei ranghi tra il gruppo normale e sotto-normale è risultato statisticamente differente con un p-value uguale.

Per quanto riguarda HbR, sono risultati statisticamente differenti due confronti:

- la coppia Fz-F4 nel dominio del cognitivo, con un p-value di 0.049; nessuno dei confronti a coppie tra i 3 gruppi è risultato statisticamente significativo (non riportato in Figura 81);
- la coppia Fz-Cz nel dominio del linguaggio, con un p-value di 0.034; la media dei ranghi tra il gruppo normale e sotto-normale è risultata statisticamente differente con un p-value uguale.

Kruskal-Wallis test results (HbO-metric Bayley scale at 2 years)

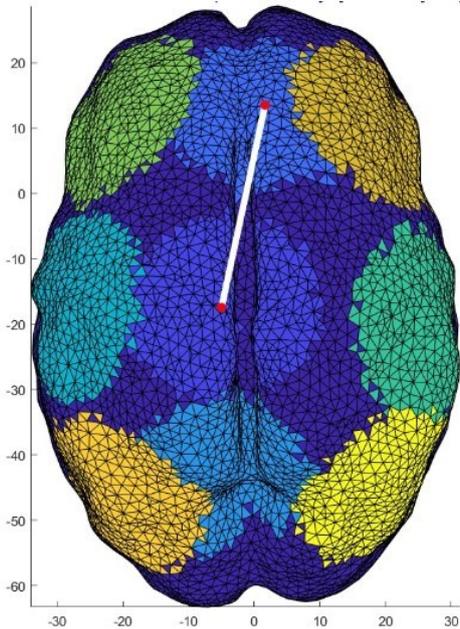


Coppia F3-F4 e Linguaggio: p-value =0.033895

Coppia Fz-F4 e Linguaggio: p-value =0.033895

Figura 80: Risultati del test di Kruskal-Wallis per HbO divisi in gruppi sulla base dei punteggi nelle scale Bayley III dei bambini ai 24 mesi di età corretta. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica sottoscala dello sviluppo indicata dallo stile della linea stessa: continua linguaggio.

Kruskal-Wallis test results (HbR-metric Bayley scale at 2 years)



Coppia Fz-Cz e Linguaggio: p-value =0.033895

Figura 81: Risultati del test di Kruskal-Wallis per HbR divisi in gruppi sulla base dei punteggi nelle scale Bayley III dei bambini ai 24 mesi di età corretta. Le linee uniscono le ROI correlate alla specifica sottoscala dello sviluppo indicata dallo stile della linea stessa: continua linguaggio.

DISCUSSIONE

I bambini nati prematuramente presentano tassi di rischio più elevati nello sviluppare difficoltà o deficit rispetto ai bambini nati a termine, ma al giorno d'oggi non sono stati identificati chiaramente dei biomarker in grado di riconoscere precocemente questa predisposizione. Di conseguenza, il presente lavoro di tesi si pone l'obiettivo di descrivere una potenziale associazione tra le funzioni cerebrali alla nascita in stato di riposo e l'esito dello sviluppo neurocognitivo a 12 e 24 mesi d'età corretta, in pazienti VP ed EP, con pesi alla nascita inferiori ai 1500g, al fine di valutare se lo sviluppo neurocognitivo a 12 e 24 mesi di età corretta in questi bambini possa essere legato allo stato di connettività a riposo del cervello durante i primi giorni di vita.

La prima fase cruciale in questo lavoro di tesi è stata quella di riuscire a selezionare i pazienti realmente eleggibili per lo studio dal dataset a disposizione, tenendo presente che lo scopo dello studio consta nell'indagare l'attività cerebrale in stato di riposo, il prima possibile dopo la nascita, e in una condizione di euglicemia. È noto, infatti, che durante episodi di iperglicemia e di ipoglicemia vi è una variazione della normale risposta emodinamica, essendo il glucosio la principale fonte di energia per il cervello [139]. In occasione di episodi ipoglicemici, ad esempio, è stato dimostrato che sono presenti delle variazioni nella circolazione sanguigna, in particolare in corrispondenza delle aree motorie, temporali e parietali, compatibili con l'ipotesi che il cervello recluti capillari che normalmente non presenterebbero un profilo di perfusione significativo, al fine di riuscire a garantire il consono apporto di glucosio ai neuroni [140]. Questa variazione non è compatibile con il concetto di resting-state, il quale studia l'attività cerebrale intrinseca e spontanea in condizioni di assenza di stimoli esterni o interni che modifichino la normale risposta emodinamica. Per questo motivo, sono stati analizzati i dati misurati con il CGM, al fine di calcolare la connettività funzionale in finestre temporali in cui il paziente era sicuramente in euglicemia. Inoltre, volendo analizzare le innate interazioni a livello corticale tra le regioni cerebrali, ovvero presenti fin dall'inizio della vita dell'individuo, è necessario scartare i pazienti che presentano episodi di ipoglicemia o iperglicemia antecedenti al primo intervallo euglicemico. Tali episodi potrebbero essere associabili a possibili danni neuronali allo strato corticale che possono intaccare le reti funzionali [34], [141].

Per i motivi sopra indicati, 7 pazienti su 29, per i quali sono presenti i risultati del follow-up a 12 mesi d'età corretta, sono stati esclusi (4 su 18 per i 24 mesi d'età corretta). Inoltre, era

necessario che il primo intervallo euglicemico venisse coperto, almeno in parte, dall'acquisizione NIRS e ciò ha portato ad una riduzione del campione a 18 pazienti (12 per i 24 mesi d'età corretta).

Tuttavia, è presente una limitazione chiave in questo studio in relazione a quest'ultimo criterio, in quanto le acquisizioni CGM iniziano entro le 48h dalla nascita, ma questo lascia scoperto un intervallo temporale antecedente, variabile a seconda del paziente, in cui non sono note alcun tipo di informazioni glicemiche e non è quindi possibile prevedere la numerosità, la durata e la gravità degli eventi che non sono stati monitorati. Sarebbe preferibile un monitoraggio a partire dal giorno 0, però è fondamentale considerare le problematiche e le priorità mediche associate alla nascita prematura come la stabilità respiratoria e cardiaca, che insieme al ricovero in terapia intensiva rendono improbabile l'avvio di un'acquisizione immediata, avendo un'urgenza massima per garantire la sopravvivenza e la salute del neonato. Inoltre, essendo Padova l'hub neonatale del triveneto, alcuni neonati prematuri vengono trasferiti qui da altri ospedali subito dopo il parto, rendendo impossibile l'inserzione del sensore CGM al tempo 0. Per tanto, i dati su cui si basa questo studio sono ciò che più si avvicina a un'acquisizione effettuata a partire dalle fasi immediatamente successive alla nascita. Una possibile direzione futura, in grado di studiare i dati da un altro punto di vista, potrebbe consistere nell'indagare le stesse correlazioni al termine dell'acquisizione, se in corrispondenza della dimissione dalla terapia intensiva, analizzando gli effetti dei fattori ambientali, derivanti dal ricovero, sulla connettività funzionale e successivamente sullo sviluppo.

Uno degli obiettivi chiave della ricerca è l'estrazione delle matrici FC relative a HbO e HbR dai migliori 5 minuti di acquisizione NIRS presenti nella prima finestra euglicemica, per comprendere i pattern delle interazioni presenti nelle diverse aree corticali in stato di riposo. La scelta di combinare 3 criteri (riportati nel capitolo 4.4) per la selezione della finestra temporale migliore, ha portato all'individuazione di segnali con pochi artefatti da movimento e un numero di nodi coperti esteso senza la perdita di informazioni in tutte le aree corticali, ad eccezione di un unico paziente (PD14), il quale presenta dei segnali piatti nella maggior parte dei canali frontali, che sembrerebbe una problematica legata all'acquisizione stessa e isolata. Il codice realizzato per questa selezione e conseguente rimozione dei canali poco informativi è l'unica parte semiautomatica dell'intero programma, poiché necessita di una modifica dei parametri nell'eliminazione dei canali regolari o contenenti livelli di rumore troppo elevati, eseguita tramite valutazioni qualitative dei segnali mantenuti e non. Un obiettivo futuro sarà

l'individuazione di un procedimento in grado di automatizzare completamente l'algoritmo d'analisi, in modo tale che possa autoregolarsi sulle esigenze delle acquisizioni del singolo paziente. Un'idea potrebbe essere quella di settare l'SNR sulla base della deviazione standard o del coefficiente di variazione degli SNR calcolati per ogni canale nella finestra di 5 minuti considerata, stabilendo successivamente una soglia basata sulla metrica di variabilità; questo approccio permetterebbe alle soglie di adattarsi alle esigenze, non solo di ciascun paziente, ma della specifica finestra. Tale metodo potrebbe essere applicato anche al criterio sullo spettro di potenza, considerando la variabilità delle frequenze negli intervalli che hanno la possibilità di contenere dei disturbi luminosi $[0.05 \div 2]$ Hz e $[3 \div 4]$ Hz consentendo una rimozione più mirata dei canali.

Nel presente studio è stato utilizzato questo metodo combinato per la selezione della finestra ottimale di euglicemia, con lo scopo di evitare potenziali distorsioni derivanti da un'eccessiva correzione dei dati o dall'assenza di sensibilità in alcune regioni durante la risoluzione del problema inverso. Alternativamente, dato lo scopo della tesi, si sarebbe potuta considerare la prima finestra disponibile per calcolare le matrici di connettività funzionale, evitando possibili variazioni nel corso del tempo. A tal proposito è stato ipotizzato che la connettività funzionale, durante uno stato di euglicemia, non cambiasse, sulla base di alcuni studi presenti in letteratura che hanno evidenziato una significativa affidabilità nel tempo delle matrici di connettività funzionale, anche se non in riferimento a soggetti prematuri [142], [143]. Tuttavia, questa ipotesi, sebbene supportata da articoli scientifici, costituisce un limite dello studio e si auspica che future ricerche possano verificare l'affidabilità delle FC, attraverso la valutazione di più finestre temporali euglicemiche per accertarsi che siano effettivamente simili.

Le problematiche incontrate nell'analisi NIRS comprendono la gestione delle interruzioni presenti nelle acquisizioni, le quali hanno limitato l'estrazione e la valutazione di tutte le finestre temporali presenti nel primo intervallo euglicemico, impedendo la loro inclusione nell'analisi; queste interruzioni sono spesso dovute alle visite dei genitori o alla necessità di eseguire test specifici o controlli di routine sul neonato da parte del personale sanitario e perciò inevitabili.

Inoltre, è stato necessario individuare un algoritmo che correggesse adeguatamente gli artefatti da movimento presenti nelle acquisizioni di tutti i pazienti, senza la necessità di adattare il metodo a ciascun individuo. Sono stati considerati diversi approcci, tra i quali quello proposto

da Yang et al. [128], ma la metodologia più efficace nell'individuazione e nella correzione degli artefatti nei segnali si è dimostrata il filtraggio wavelet [127].

Le matrici FC individuate, per la maggior parte dei pazienti, presentano pattern simili tra HbO e HbR, come ci si aspetterebbe in un cervello totalmente sviluppato, dove all'aumentare delle variazioni di concentrazione di HbO corrisponde una diminuzione delle variazioni di HbR in entrambe le aree. In alcuni casi particolari le differenze tra i pattern delle due matrici sono presenti nella maggioranza delle correlazioni tra aree cerebrali ed allo stesso tempo più marcate. Nello specifico è possibile notare che questa caratteristica è presente nei pazienti con età gestazionali alla nascita inferiori alla 30esima settimana, oppure, se nati oltre le 30 settimane di gestazione, con un peso alla nascita significativamente inferiore rispetto a quanto atteso per l'età gestazionale (legato quindi a un blocco nello sviluppo). Questi risultati sono in linea con quanto riportato in letteratura, dove viene evidenziato che le reti dello stato di riposo sono sottosviluppate in neonati estremamente prematuri, molto probabilmente, a causa di uno sviluppo alterato dei sistemi neuro-vascolari e metabolici nella corteccia cerebrale in neonati nati a meno di 30 settimane gestazionali [55], [144], [145]. È infatti durante questo periodo che nel feto iniziano a svilupparsi vasi arteriosi, capillari (che poi proseguiranno il loro ampliamento durante i primi 3 mesi di vita) e strutture sinaptiche, ovvero quando la migrazione neuronale termina e inizia lo sviluppo della corteccia e del suo corretto irroramento [145]. Il passaggio all'ambiente extrauterino durante questo periodo di completamento della migrazione neuronale influisce direttamente sulla connettività funzionale, specialmente finché la matrice germinale subependimale non inizia la sua involuzione [145].

In seguito, verranno presentati e discussi i risultati finali ottenuti in questa ricerca e le loro implicazioni. Nel corso dello studio sono stati eseguite le correlazioni tra le metriche dello sviluppo raccolte ai 12 e 24 mesi d'età corretta e i valori delle matrici rs-FC riferite ai due cromofori misurate alla nascita. Al momento i p-value che sono stati ottenuti non sono sufficientemente bassi da risultare significativi in seguito alla correzione per confronti multipli; per individuare quali correlazioni siano effettivamente reali e robuste sarà necessario ripetere le analisi quando il campione sarà più ampio.

Nei risultati del test Gap-Overlap, è interessante notare che la correlazione dei valori nelle rs-FC e le metriche di questo specifico test all'età corretta di 12 mesi sono coerenti, tra HbO e HbR, nell'individuare la coppia Fz-C3 correlata con l'effetto Gap, che per entrambi i cromofori presenta il p-value più basso, seppur non sufficiente per la correzione per confronti multipli. Il

risultato sembrerebbe indicare che la connettività tra queste due ROI sia importante per lo sviluppo dei processi attentivi. In particolare, all'aumentare della correlazione tra ROI, diminuisce l'effetto Gap, implicando un'associazione tra un'alta connettività fronto-motoria alla nascita e la successiva velocità di disancoraggio attentivo in presenza ed assenza di stimoli precedenti. La coppia di ROI Fz-C3, nello specifico, è situata tra la corteccia frontale e motoria, in linea con il compito di attenzione visiva assegnato, in quanto la zona frontale gestisce le capacità esecutive, quali il disancoraggio e l'ancoraggio dello stimolo, mentre la corteccia motoria potrebbe essere legata alla regolamentazione dei movimenti oculari [6], [7], [79]. Nelle altre ROI significative emergono dei risultati differenti per HbO e HbR che potrebbero essere spiegati con un'immaturità del sistema neuro-vascolare della corteccia nel neonato prematuro, relativa a queste zone, che hanno evidentemente uno sviluppo differente nella gestione dei due cromofori nella connettività a riposo. Oppure, potrebbe essere dovuto al numero di pazienti limitato, per cui emergono significativi in un cromoforo e non nell'altro, perché presentano un p-value appena sovrastante la soglia di significatività.

La correlazione con le metriche del test sulla memoria visiva non mostra alcuna concordanza tra HbO e HbR, ma il risultato principale, per entrambi i cromofori, sembra legato prettamente al tempo totale di fissazione, che può essere considerato più un indice legato all'attenzione che mnemonico. Per tanto, l'associazione sembrerebbe essere presente tra la connettività e lo sviluppo neurocognitivo attentivo, suggerendo che in futuri studi sarebbe meglio concentrarsi nel testare tipologie differenti di attenzione piuttosto che di memoria.

I risultati della correlazione con i punteggi delle scale Bayley III, ai 12 mesi di età corretta, non sono chiari e presentano coppie di ROI in HbO e HbR discordanti per tutte le scale ed essendo di difficile interpretazione richiedono inevitabilmente l'attesa di una coorte più numerosa in modo tale da non lasciare spazio a fraintendimenti.

Nel caso dei risultati ottenuti con il test di Kruskal-Wallis ai 12 mesi d'età corretta, eseguiti sui punteggi nelle scale Bayley III, l'obiettivo è valutare, in base a un deficit che emerge dalle valutazioni cliniche negli specifici domini, se sono presenti delle differenze tra gruppi nella connettività tra aree corticali alla nascita. Bisogna tenere in considerazione che spesso i gruppi sopra-normalità e sotto-normalità sono molto limitati in termine di numero di pazienti e i risultati devono essere soppesati tenendo in considerazione questo limite. Dal test risulta che i pazienti con punteggio nel dominio socio-emozionale sotto-normalità hanno una FC diversa da quelli del gruppo in normalità nelle coppie di ROI F4-Cz e F4-P4. È bene ricordare che il

punteggio del dominio socio-emozionale è calcolato su un questionario sottoposto al genitore e per tanto meno affidabile rispetto agli altri punteggi che sono valutati sul bambino, ma comunque basandosi su una scala validata può indicare delle difficoltà che il genitore percepisce riguardo a suo figlio nell'ambito socio-emozionale. Il risultato potrebbe essere poco affidabile in quanto si regge su un unico campione situato nel gruppo con punteggi al di sotto della normalità e per un'eventuale conferma di questo risultato è necessario un aumento della numerosità dei campioni. È interessante notare che la coppia di ROI F4-Cz è presente anche tra le correlazioni statisticamente significative calcolate con Spearman per HbO tra le matrici FC e il punteggio socio-emozionale delle Bayley (Figura 68). In tale contesto, la correlazione mostrava un coefficiente di correlazione positivo, risultato che suggerisce che all'aumento dell'attività coordinata nelle due aree delle ROI si individua un aumento dei punteggi in questo dominio, sebbene la collocazione di quest'ultimo nelle funzioni della corteccia cerebrale non sia in realtà assegnabile univocamente, ma associabile a un processo molto complesso non ancora definito in letteratura.

Nel caso del linguaggio, i gruppi normale e sotto-normalità differiscono significativamente con un p-value di 0.028 nelle aree corticali P3-P4 per HbO e Pz-P3 in HbR. Il centro del linguaggio è situato nelle zone temporali del cervello, che non sono state oggetto di monitoraggio in questo studio, per evitare disagi al neonato e dato il numero di optodi a disposizione. Tuttavia, in un cervello prematuro sembrano risultare importanti, ai fini della connettività cerebrale, le zone parietali. Il solco intraparietale è un'area coinvolta nel controllo di diverse funzioni cognitive, come l'attenzione e la memoria, che di conseguenza possono influenzare il linguaggio in quanto necessarie nella produzione e nella comprensione di quest'ultimo [146]. Non sorprende quindi che proprio la connettività tra ROI parietali possa essere diversa tra pazienti con diverso esito del neurosviluppo.

Questo risultato non è presente nel caso delle correlazioni generali eseguite con Spearman, molto probabilmente perché la numerosità del gruppo di normalità è nettamente superiore e direziona la correlazione, non rendendo possibile apprezzare queste sottili differenze. Inoltre, punteggi più bassi in questo dominio potrebbero essere assegnati a bambini che stanno imparando più lingue contemporaneamente, in quanto bambini bi o trilingue solitamente hanno un ritardo nello sviluppo del linguaggio durante i primi anni di vita, e il risultato potrebbe essere soggetto a fattori di confondimento.

Nei risultati ottenuti ai 24 mesi d'età corretta nel caso del test Gap-Overlap si viene a perdere la correlazione coerente tra i due cromofori individuata ai 12 mesi, ma emerge una nuova correlazione coerente tra i due cromofori nelle aree Cz-P4 con la media delle latenze saccadiche nella condizione "Gap". La correlazione indica che i bambini con tempi saccadici più veloci nella condizione "Gap" sono quelli con una connettività tra Cz e P4 maggiore. Lo spostamento delle ROI interessate dalla correlazione tra 12 e 24 mesi di età corretta potrebbe indicare una diversa prestazione al compito da parte dei bambini alle due diverse età, con differenze nel campione che si possono percepire e correlare solo in tempi diversi di maturazione cognitiva. La connettività tra il motorio e il parietale non sorprende, poiché la corteccia parietale svolge un ruolo importante nell'attenzione spaziale, selezionando e focalizzando l'attenzione su determinate aree dello spazio visivo, sfruttando le reti funzionali fronto-parietali [147].

Nel paradigma sperimentale *Simultaneous Stream Change Detection Task* vengono individuate coerentemente 3 coppie di ROI correlate al parametro preferenza al cambiamento per il "Set Size 3", la condizione più difficile: F3-Fz, Fz-C3 e Fz-C4 che presentano tutte l'area corticale Fz, suggerendo che l'attività in quest'area possa essere fondamentale per lo sviluppo delle capacità mnemoniche. La corteccia frontale è responsabile del controllo esecutivo, che include la capacità di selezionare, organizzare e manipolare informazioni memorizzate, stabilire priorità tra diversi elementi visivi da ricordare o a riorientare l'attenzione verso informazioni visive rilevanti [7], [79]. È bene ricordare che il paradigma per testare la memoria usato ai 12 mesi di età corretta e ai 24 mesi era diverso e, quello a 24 mesi, è molto più difficile da svolgere per i bambini. Questo potrebbe aver favorito l'emergere di differenze tra i pazienti ai 24 mesi di età corretta in modo più prominente di quelle che si potevano valutare ai 12 mesi.

Per quanto concerne i risultati del test di Kruskal-Wallis, ai 24 mesi d'età corretta, vengono individuate le coppie di ROI F3-F4, Fz-F4 per HbO e Fz-Cz in HbR che differiscono in modo significativo nella connettività tra i gruppi sotto-normalità e normalità con lo sviluppo del linguaggio. Anche in questo caso è necessario considerare che la numerosità del primo gruppo è di 2 bambini. La corteccia frontale, come già riportato in precedenza, è fortemente correlata ai processi attentivi e mnemonici visivi e il processo di comprensione del linguaggio può comportare l'associazione delle informazioni di carattere visivo con quelle memorizzate per questo dominio, al fine di comprendere e interpretare ciò che si sta vedendo, coinvolgendo quindi le regioni frontali [6], [147].

Tra i limiti dello studio, è necessario considerare che la corteccia occipitale, legata direttamente alla percezione visiva, nella rilevazione di colori, forme, movimenti, nel riconoscimento di oggetti, nella rappresentazione mentale del mondo circostante sulla base delle informazioni visive, e la corteccia temporale, coinvolta nella memorizzazione, nel recupero delle informazioni e nel riconoscimento delle parole e del linguaggio, non vengono monitorate in questo studio e questo potrebbe risultare in una perdita di informazioni significative. Perciò, sarebbe necessario aumentare la copertura aggiungendo dei canali NIRS di misurazione in queste aree. Attualmente è infattibile, considerando i macchinari di monitoraggio presenti, la posizione supina di un neonato in terapia intensiva e l'impossibilità di imporre l'immobilità o andare a limitare i movimenti di quest'ultimo con una cuffia così ingombrante e costringente, però con il progresso tecnologico nel futuro potranno emergere nuove soluzioni che rendano questa opzione possibile (come, ad esempio, i nuovi dispositivi progettati senza fili e quindi meno ingombranti [3]).

In questo studio vengono messi direttamente a confronto dati provenienti da età gestazionali e pesi alla nascita molto variabili. Come riportato nell'introduzione a questa tesi, è noto che al diminuire dell'età gestazionale, aumenta la probabilità di sviluppare deficit nello sviluppo neuro-cognitivo [60], [61] ed idealmente bisognerebbe tenere in considerazione queste caratteristiche tramite delle covariate o dei regressori in un'analisi statistica finale, per valutare quanta varianza essi possono descrivere. Infatti, questi fattori già da soli potrebbero spiegare alcune differenze individuate negli esiti del neurosviluppo, dove più un neonato risulta prematuro, più è probabile che presenti problematiche. Nell'analisi globale del progetto, che verrà eseguita quando la numerosità del campione sarà sufficiente da trarre conclusioni generalizzabili, queste caratteristiche verranno considerate nell'indagine statistica.

CONCLUSIONI

I dati utilizzati in questo studio fanno parte di un dataset unico al mondo, attualmente in fase di raccolta, che contiene informazioni relative al monitoraggio continuo della glicemia (CGM) e alle misurazioni dell'emodinamica cerebrale mediante spettroscopia nel vicino infrarosso effettuate durante la prima settimana di vita in neonati prematuri ricoverati in terapia intensiva neonatale e i risultati del test sul neurosviluppo eseguiti durante i follow-up a 12 e 24 mesi d'età corretta. L'obiettivo è quello di individuare possibili reti funzionali alla nascita, presenti fin da subito, la cui connettività risulti associata ai punteggi ottenuti nella valutazione dello sviluppo. Poiché il dataset è unico nel suo genere è stato necessario sviluppare algoritmi e nuove tecniche d'analisi specificatamente applicabili ai dati a disposizione ed in grado di elaborarli in modo coerente a seconda delle problematiche presenti nelle singole acquisizioni.

I risultati ad ora ottenuti non sono significativi dopo la correzione per confronti multipli, probabilmente data la bassa numerosità della coorte attualmente disponibile. Per verificare l'effettiva presenza di correlazioni consistenti è necessario attendere un aumento del numero dei dati raccolti.

Ciò che emerge da un'analisi esplorativa sono delle associazioni tra alcuni indici che misurano l'efficienza dell'attenzione visiva e la connettività tra la zona frontale e motoria già ai 12 mesi d'età corretta. Tale associazione si viene a perdere ai 24 mesi a favore di una nuova associazione tra tali indici e la connettività tra la zona motoria e parietale. Questi risultati sembrano indicare una possibile presenza di marker funzionali nella connettività a riposo alla nascita che potrebbero predire lo sviluppo attentivo del bambino ai 12 e 24 mesi di età corretta. Ulteriori analisi, che potrebbero valutarne la causalità e l'efficacia di predizione, sono necessarie in futuro per valutare questa possibilità.

Per quanto concerne gli indici comportamentali associati alla memoria visiva, ai 12 mesi d'età corretta non sono presenti delle correlazioni coerenti tra i due cromofori per nessuna coppia di ROI tra tali indici e la connettività alla nascita, mentre ai 24 mesi emergono diverse correlazioni localizzate nella zona corticale motoria-frontale. Le aree frontali e parietali sono solitamente interessate durante task che coinvolgono la memoria poiché sono la sede, rispettivamente, del controllo esecutivo e del controllo dell'attenzione e della memoria. Questi risultati sembrano indicare una possibile associazione tra la connettività alla nascita e alcuni indici relativi allo sviluppo mnemonico, anche se tali associazioni emergono solo ai 24 mesi di età corretta e

l'indice comportamentale che risulta più correlato potrebbe essere valutato più come un indice attento che mnemonico. Sembrerebbe quindi che lo sviluppo dell'attenzione, più che della memoria, possa essere legato allo stato della connettività funzionale alla nascita.

Dai risultati di questa tesi emergono anche delle associazioni tra la connettività alla nascita e alcuni indici relativi alle scale Bayley III: le evidenze più promettenti includono una correlazione con le zone parietali ai 12 mesi di vita e frontali ai 24 mesi e l'indice di sviluppo del linguaggio, dominio che è legato strettamente alle abilità attentive e mnemoniche, andando a ricalcare i risultati trovati per queste funzioni cognitive.

Interessanti sono anche i risultati emersi valutando le differenze di connettività alla nascita tra gruppi di pazienti che presentano indici nel range o fuori dal range di normalità secondo le scale Bayley. Le evidenze più interessanti mostrano differenze principalmente tra il gruppo nel range di normalità e quello sotto la normalità per i domini socioemozionale ai 12 mesi e linguistico sia ai 12 che ai 24 mesi. Anche in questo caso i risultati vanno valutati alla luce della scarsa numerosità del campione sperimentale e dovranno essere validate in futuro quando il campione sarà più numeroso.

In conclusione, le valutazioni preliminari che emergono da questo lavoro di tesi sembrano indicare la presenza di associazioni tra la connettività funzionale alla nascita tra alcune ROI e alcuni indici comportamentali di sviluppo ai 12 e 24 mesi di età corretta, in particolare per quanto concerne lo sviluppo attento e linguistico. Questi risultati potrebbero implicare, se confermati all'aumentare del campione e con eventuali altre analisi causali di connettività, che i network di resting state alla nascita possano essere dei biomarcatori in grado di predire il possibile sviluppo attento e cognitivo dei pazienti molto precocemente.

BIBLIOGRAFIA

- [1] N. M. Davis, G. W. Ford, P. J. Anderson, and L. W. Doyle, “Developmental coordination disorder at 8 years of age in a regional cohort of extremely-low-birthweight or very preterm infants”, *Dev Med Child Neurol*, vol. 49, no. 5, pp. 325–330, May 2007, doi: 10.1111/j.1469-8749.2007.00325.x.
- [2] N. Barre, A. Morgan, L. W. Doyle, and P. J. Anderson, “Language abilities in children who were very preterm and/or very low birth weight: A meta-analysis”, *Journal of Pediatrics*, vol. 158, no. 5, 2011, doi: 10.1016/j.jpeds.2010.10.032.
- [3] J. Uchitel *et al.*, “Cot-side imaging of functional connectivity in the developing brain during sleep using wearable high-density diffuse optical tomography”, *Neuroimage*, vol. 265, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.neuroimage.2022.119784.
- [4] H. Ballieux *et al.*, “Applying gaze-contingent training within community settings to infants from diverse SES backgrounds”, *J Appl Dev Psychol*, vol. 43, pp. 8–17, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.appdev.2015.12.005.
- [5] M.-K. Kwon, S. J. Luck, and L. M. Oakes, “Visual short-term memory for complex objects in 6- and 8-month-old infants.”, *Child Dev*, vol. 85, no. 2, pp. 564–77, 2014, doi: 10.1111/cdev.12161.
- [6] A. C. (Kia) Nobre and S. Kastner, Eds., *The Oxford Handbook of Attention*, vol. 1. Oxford University Press, 2014. doi: 10.1093/oxfordhb/9780199675111.001.0001.
- [7] J. Fan *et al.*, “Testing the behavioral interaction and integration of attentional networks”, *Brain Cogn*, vol. 70, no. 2, pp. 209–220, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.bandc.2009.02.002.
- [8] J. M. Murkin and M. Arango, “Near-infrared spectroscopy as an index of brain and tissue oxygenation”, *Br J Anaesth*, vol. 103, pp. i3–i13, Dec. 2009, doi: 10.1093/bja/aep299.
- [9] Brigadoi S. and Cooper R. J., *Diffuse Optical Imaging*. 2017.
- [10] K.-S. Hong and A. Zafar, “Existence of Initial Dip for BCI: An Illusion or Reality”, *Front Neurorobot*, vol. 12, Oct. 2018, doi: 10.3389/fnbot.2018.00069.
- [11] J. Gervain *et al.*, “Near-infrared spectroscopy: A report from the McDonnell infant methodology consortium”, *Dev Cogn Neurosci*, vol. 1, no. 1, pp. 22–46, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.dcn.2010.07.004.
- [12] I. de Roeper, G. Bale, S. Mitra, J. Meek, N. J. Robertson, and I. Tachtsidis, “Investigation of the Pattern of the Hemodynamic Response as Measured by Functional Near-Infrared

- Spectroscopy (fNIRS) Studies in Newborns, Less Than a Month Old: A Systematic Review”, *Front Hum Neurosci*, vol. 12, Oct. 2018, doi: 10.3389/fnhum.2018.00371.
- [13] P. Pinti *et al.*, “The present and future use of functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) for cognitive neuroscience”, *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1464, no. 1, pp. 5–29, Mar. 2018, doi: 10.1111/nyas.13948.
- [14] C. W. Lee, R. J. Cooper, and T. Austin, “Diffuse optical tomography to investigate the newborn brain”, *Pediatr Res*, vol. 82, no. 3, pp. 376–386, Sep. 2017, doi: 10.1038/pr.2017.107.
- [15] S. R. Hintz, D. A. Benaron, A. M. Siegel, A. Zourabian, D. K. Stevenson, and D. A. Boas, “Bedside functional imaging of the premature infant brain during passive motor activation”, *J Perinat Med*, vol. 29, no. 4, Jan. 2001, doi: 10.1515/JPM.2001.048.
- [16] J. H. Meek, M. Firbank, C. E. Elwell, J. Atkinson, O. Braddick, and J. S. Wyatt, “Regional Hemodynamic Responses to Visual Stimulation in Awake Infants”, *Pediatr Res*, vol. 43, no. 6, pp. 840–843, Jun. 1998, doi: 10.1203/00006450-199806000-00019.
- [17] P. Zaramella *et al.*, “Brain Auditory Activation Measured by Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) in Neonates”, *Pediatr Res*, vol. 49, no. 2, pp. 213–219, Feb. 2001, doi: 10.1203/00006450-200102000-00014.
- [18] M. Bartocci, J. Winberg, C. Ruggiero, L. L. Bergqvist, G. Serra, and H. Lagercrantz, “Activation of Olfactory Cortex in Newborn Infants After Odor Stimulation: A Functional Near-Infrared Spectroscopy Study”, *Pediatr Res*, vol. 48, no. 1, pp. 18–23, Jul. 2000, doi: 10.1203/00006450-200007000-00006.
- [19] M. Ferrari and V. Quaresima, “A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application”, *Neuroimage*, vol. 63, no. 2, pp. 921–935, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.03.049.
- [20] B. Chance *et al.*, “A novel method for fast imaging of brain function, non-invasively, with light”, *Opt Express*, vol. 2, no. 10, p. 411, May 1998, doi: 10.1364/OE.2.000411.
- [21] S. M. Liao, Silvina L Ferradal, Brian R White, Nicholas Gregg, Terrie E Inder, and Joseph P Culver, “High-density diffuse optical tomography of term infant visual cortex in the nursery”, *J Biomed Opt*, vol. 17, no. 8, p. 081414, Jul. 2012, doi: 10.1117/1.JBO.17.8.081414.

- [22] B. R. White, S. M. Liao, S. L. Ferradal, T. E. Inder, and J. P. Culver, “Bedside optical imaging of occipital resting-state functional connectivity in neonates”, *Neuroimage*, vol. 59, no. 3, pp. 2529–2538, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.08.094.
- [23] A. Galderisi *et al.*, “Long-term continuous monitoring of the preterm brain with diffuse optical tomography and electroencephalography: a technical note on cap manufacturing”, *Neurophotonics*, vol. 3, no. 4, p. 045009, Dec. 2016, doi: 10.1117/1.nph.3.4.045009.
- [24] R. J. Cooper *et al.*, “Transient haemodynamic events in neurologically compromised infants: A simultaneous EEG and diffuse optical imaging study”, *Neuroimage*, vol. 55, no. 4, pp. 1610–1616, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.01.022.
- [25] J. Lawn, K. Shibuya, and C. Stein, “No cry at birth: global estimates of intrapartum stillbirths and intrapartum-related neonatal deaths.”, *Bull World Health Organ*, vol. 83, no. 6, pp. 409–17, Jun. 2005.
- [26] T. Wilcox and M. Biondi, “fNIRS in the developmental sciences(Review)”, *WIREs Cognitive Science*, vol. 6, no. 3, pp. 263–283, May 2015, doi: 10.1002/wcs.1343.
- [27] V. Quaresima, S. Bisconti, and M. Ferrari, “A brief review on the use of functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) for language imaging studies in human newborns and adults”, *Brain Lang*, vol. 121, no. 2, pp. 79–89, May 2012, doi: 10.1016/j.bandl.2011.03.009.
- [28] C. Peng and X. Hou, “Applications of functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) in neonates”, *Neurosci Res*, vol. 170, pp. 18–23, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.neures.2020.11.003.
- [29] Nicholas M Gregg, Brian R White, Benjamin W Zeff, Andrew J Berger, and Joseph P Culver, “Brain specificity of diffuse optical imaging: improvements from superficial signal regression and tomography”, *Front Neuroenergetics*, 2010, doi: 10.3389/fnene.2010.00014.
- [30] R. Saager and A. Berger, “Measurement of layer-like hemodynamic trends in scalp and cortex: implications for physiological baseline suppression in functional near-infrared spectroscopy”, *J Biomed Opt*, vol. 13, no. 3, p. 034017, 2008, doi: 10.1117/1.2940587.
- [31] L. Gagnon, K. Perdue, D. N. Greve, D. Goldenholz, G. Kaskhedikar, and D. A. Boas, “Improved recovery of the hemodynamic response in diffuse optical imaging using short

- optode separations and state-space modeling”, *Neuroimage*, vol. 56, no. 3, pp. 1362–1371, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.03.001.
- [32] S. Brigadoi and R. J. Cooper, “How short is short? Optimum source–detector distance for short-separation channels in functional near-infrared spectroscopy”, *Neurophotonics*, vol. 2, no. 2, p. 025005, May 2015, doi: 10.1117/1.NPh.2.2.025005.
- [33] M. Chalia *et al.*, “Hemodynamic response to burst-suppressed and discontinuous electroencephalography activity in infants with hypoxic ischemic encephalopathy”, *Neurophotonics*, vol. 3, no. 03, p. 1, May 2016, doi: 10.1117/1.NPh.3.3.031408.
- [34] H. Singh *et al.*, “Mapping cortical haemodynamics during neonatal seizures using diffuse optical tomography: A case study”, *Neuroimage Clin*, vol. 5, pp. 256–265, 2014, doi: 10.1016/j.nicl.2014.06.012.
- [35] S. L. Ferradal, A. T. Eggebrecht, M. Hassanpour, A. Z. Snyder, and J. P. Culver, “Atlas-based head modeling and spatial normalization for high-density diffuse optical tomography: In vivo validation against fMRI”, *Neuroimage*, vol. 85, pp. 117–126, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.03.069.
- [36] R. J. Cooper *et al.*, “Validating atlas-guided DOT: A comparison of diffuse optical tomography informed by atlas and subject-specific anatomies”, *Neuroimage*, vol. 62, no. 3, pp. 1999–2006, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.05.031.
- [37] M. D. Fox and M. E. Raichle, “Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging”, *Nat Rev Neurosci*, vol. 8, no. 9, pp. 700–711, Sep. 2007, doi: 10.1038/nrn2201.
- [38] H. Niu and Y. He, “Resting-State Functional Brain Connectivity”, *The Neuroscientist*, vol. 20, no. 2, pp. 173–188, Apr. 2014, doi: 10.1177/1073858413502707.
- [39] H. Niu *et al.*, “Resting-state functional connectivity assessed with two diffuse optical tomographic systems”, *J Biomed Opt*, vol. 16, no. 4, p. 046006, 2011, doi: 10.1117/1.3561687.
- [40] B. R. White *et al.*, “Resting-state functional connectivity in the human brain revealed with diffuse optical tomography”, *Neuroimage*, vol. 47, no. 1, pp. 148–156, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.03.058.
- [41] B. R. White, S. M. Liao, S. L. Ferradal, T. E. Inder, and J. P. Culver, “Bedside optical imaging of occipital resting-state functional connectivity in neonates”, *Neuroimage*, vol. 59, no. 3, pp. 2529–2538, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.08.094.

- [42] S. Sasai, F. Homae, H. Watanabe, and G. Taga, “Frequency-specific functional connectivity in the brain during resting state revealed by NIRS”, *Neuroimage*, vol. 56, no. 1, pp. 252–257, May 2011, doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.12.075.
- [43] R. C. Mesquita, M. A. Franceschini, and D. A. Boas, “Resting state functional connectivity of the whole head with near-infrared spectroscopy”, *Biomed Opt Express*, vol. 1, no. 1, p. 324, Aug. 2010, doi: 10.1364/BOE.1.000324.
- [44] C.-M. Lu, Y.-J. Zhang, B. B. Biswal, Y.-F. Zang, D.-L. Peng, and C.-Z. Zhu, “Use of fNIRS to assess resting state functional connectivity”, *J Neurosci Methods*, vol. 186, no. 2, pp. 242–249, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.11.010.
- [45] F. Homae *et al.*, “Development of Global Cortical Networks in Early Infancy”, *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 14, pp. 4877–4882, Apr. 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5618-09.2010.
- [46] Y.-J. Zhang, L. Duan, H. Zhang, B. B. Biswal, C.-M. Lu, and C.-Z. Zhu, “Determination of Dominant Frequency of Resting-State Brain Interaction within One Functional System”, *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e51584, Dec. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0051584.
- [47] S. Sasai *et al.*, “A NIRS–fMRI study of resting state network”, *Neuroimage*, vol. 63, no. 1, pp. 179–193, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.06.011.
- [48] M. D. Fox, A. Z. Snyder, J. L. Vincent, M. Corbetta, D. C. Van Essen, and M. E. Raichle, “The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, no. 27, pp. 9673–9678, Jul. 2005, doi: 10.1073/pnas.0504136102.
- [49] S. B. Eickhoff *et al.*, “Anatomical and Functional Connectivity of Cytoarchitectonic Areas within the Human Parietal Operculum”, *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 18, pp. 6409–6421, May 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5664-09.2010.
- [50] R. M. Birn, “The role of physiological noise in resting-state functional connectivity”, *Neuroimage*, vol. 62, no. 2, pp. 864–870, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.01.016.
- [51] N. Duncan and G. Northoff, “Overview of potential procedural and participant- related confounds for neuroimaging of the resting state”, *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, vol. 38, no. 2, pp. 84–96, Mar. 2013, doi: 10.1503/jpn.120059.

- [52] S. L. Ferradal *et al.*, “Functional Imaging of the Developing Brain at the Bedside Using Diffuse Optical Tomography”, *Cerebral Cortex*, vol. 26, no. 4, pp. 1558–1568, Apr. 2016, doi: 10.1093/cercor/bhu320.
- [53] Y. Fuchino *et al.*, “Effects of Preterm Birth on Intrinsic Fluctuations in Neonatal Cerebral Activity Examined Using Optical Imaging”, *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e67432, Jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0067432.
- [54] Z. Hu, G. Liu, Q. Dong, and H. Niu, “Applications of Resting-State fNIRS in the Developing Brain: A Review From the Connectome Perspective.”, *Front Neurosci*, vol. 14, p. 476, 2020, doi: 10.3389/fnins.2020.00476.
- [55] T. Arimitsu, N. Shinohara, Y. Minagawa, E. Hoshino, M. Hata, and T. Takahashi, “Differential age-dependent development of inter-area brain connectivity in term and preterm neonates”, *Pediatr Res*, vol. 92, no. 4, pp. 1017–1025, Oct. 2022, doi: 10.1038/s41390-022-01939-7.
- [56] I. L. Hand *et al.*, “Routine Neuroimaging of the Preterm Brain”, *Pediatrics*, vol. 146, no. 5, Nov. 2020, doi: 10.1542/peds.2020-029082.
- [57] JJ. Volpe, *Neurology of the newborn.*, vol. Vol. 5th edn. Philadelphia: Elsevier, 2008.
- [58] D. Wolke, M. Samara, M. Bracewell, and N. Marlow, “Specific Language Difficulties and School Achievement in Children Born at 25 Weeks of Gestation or Less”, *Journal of Pediatrics*, vol. 152, no. 2, 2008, doi: 10.1016/j.jpeds.2007.06.043.
- [59] M. D. Pasquale J. Accardo, *Neurodevelopmental Disabilities in Infancy and Childhood, Third Edition: Volume I: Neurodevelopmental Diagnosis and Treatment*, 3rd ed., vol. Vol 1. Baltimore: MD: Paul H. Brookes Publishing Co, 2008.
- [60] H. T. Myrhaug, K. G. Brurberg, L. Hov, and T. Markestad, “Survival and impairment of extremely premature infants: A Meta-analysis”, *Pediatrics*, vol. 143, no. 2. American Academy of Pediatrics, Feb. 01, 2019. doi: 10.1542/peds.2018-0933.
- [61] In Gyu Song, “Neurodevelopmental outcome of preterm infants”, *Clin Exp Pediatr*, vol. 66, no. 7, pp. 281–287, Oct. 2023, doi: 10.3345/cep.2022.00822.
- [62] G. Mento and P. S. Bisiacchi, “Sviluppo neuro-cognitivo in nati pretermine: la prospettiva delle Neuroscienze cognitive dello sviluppo”, *Psicologia clinica dello sviluppo*, 2013, doi: 10.1449/73825.

- [63] G. Mento and P. S. Bisiacchi, “Neurocognitive development in preterm infants: Insights from different approaches”, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 36, no. 1. pp. 536–555, Jan. 2012. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.08.008.
- [64] P. Gressens, M. Rogido, B. Paindaveine, and A. Sola, “The impact of neonatal intensive care practices on the developing brain”, *Journal of Pediatrics*, vol. 140, no. 6, pp. 646–653, 2002, doi: 10.1067/mpd.2002.123214.
- [65] J. Dubois *et al.*, “Mapping the early cortical folding process in the preterm newborn brain”, *Cerebral Cortex*, vol. 18, no. 6, pp. 1444–1454, Jun. 2008, doi: 10.1093/cercor/bhm180.
- [66] J. Dubois *et al.*, “Primary cortical folding in the human newborn: An early marker of later functional development”, *Brain*, vol. 131, no. 8, pp. 2028–2041, 2008, doi: 10.1093/brain/awn137.
- [67] A. T. Bhutta, M. A. Cleves, P. H. Casey, M. M. Cradock, and K. J. S. Anand, “Cognitive and Behavioral Outcomes of School-Aged Children Who Were Born Preterm A Meta-analysis”, *American Medical Association.*, vol. 288, no. 6, Aug. 2002, [Online]. Available: <https://jamanetwork.com/>
- [68] P. J. Anderson and D. Dewey, “Introduction: The consequences of being born very early or very small”, *Dev Neuropsychol*, vol. 36, no. 1, pp. 1–4, Jan. 2011, doi: 10.1080/87565641.2011.540522.
- [69] A. Guarini, A. Sansavini, C. Fabbri, R. Alessandroni, G. Faldella, and A. Karmiloff-Smith, “Reconsidering the impact of preterm birth on language outcome”, *Early Hum Dev*, vol. 85, no. 10, pp. 639–645, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2009.08.061.
- [70] A. M. Dall’Oglio *et al.*, “Developmental evaluation at age 4: Validity of an Italian parental questionnaire”, *J Paediatr Child Health*, vol. 46, no. 7–8, pp. 419–426, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.1440-1754.2010.01748.x.
- [71] A. Sansavini, A. Guarini, and M. C. Castelli, “Preterm birth: Neuropsychological profiles and atypical developmental pathways”, *Dev. Disabil. Res. Rev.*, vol. 17, pp. 102–113, 2011.
- [72] A. Sansavini, S. Savini, A. Guarini, S. Broccoli, R. Alessandroni, and G. Faldella, “The effect of gestational age on developmental outcomes: A longitudinal study in the first 2 years of life”, *Child Care Health Dev*, vol. 37, no. 1, pp. 26–36, Jan. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2214.2010.01143.x.

- [73] A. Pascal, P. Govaert, A. Oostra, G. Naulaers, E. Ortibus, and C. Van den Broeck, “Neurodevelopmental outcome in very preterm and very-low-birthweight infants born over the past decade: a meta-analytic review”, *Developmental Medicine and Child Neurology*, vol. 60, no. 4. Blackwell Publishing Ltd, pp. 342–355, Apr. 01, 2018. doi: 10.1111/dmcn.13675.
- [74] S. Foster-Cohen, J. O. Edgin, P. R. Champion, and L. J. Woodward, “Early delayed language development in very preterm infants: Evidence from the MacArthur-Bates CDI”, *J Child Lang*, vol. 34, no. 3, pp. 655–675, Aug. 2007, doi: 10.1017/S0305000907008070.
- [75] S. Kern and F. Gayraud, “Influence of preterm birth on early lexical and grammatical acquisition”, *First Lang*, vol. 27, no. 2, pp. 159–173, 2007, doi: 10.1177/0142723706075790.
- [76] C. Nosarti *et al.*, “Grey and white matter distribution in very preterm adolescents mediates neurodevelopmental outcome”, *Brain*, vol. 131, no. 1, pp. 205–217, Jan. 2008, doi: 10.1093/brain/awm282.
- [77] J. O. EDGIN, T. E. INDER, P. J. ANDERSON, K. M. HOOD, C. A. C. CLARK, and L. J. WOODWARD, “Executive functioning in preschool children born very preterm: Relationship with early white matter pathology”, *Journal of the International Neuropsychological Society*, vol. 14, no. 1, pp. 90–101, Jan. 2008, doi: 10.1017/S1355617708080053.
- [78] VandenBos and G. R. (Ed.), “APA Dictionary of Psychology.”, *American Psychological Association*. 2007.
- [79] M. I. Posner and S. E. Petersen, “The Attention System of the Human Brain”, *Annu Rev Neurosci*, vol. 13, no. 1, pp. 25–42, Mar. 1990, doi: 10.1146/annurev.ne.13.030190.000325.
- [80] M. Bonin, A. Pomerleau, and G. Malcuit, “A longitudinal study of visual attention and psychomotor development in preterm and full-term infants during the first six months of life”, *Infant Behav Dev*, vol. 21, no. 1, pp. 103–118, Jan. 1998, doi: 10.1016/S0163-6383(98)90057-1.
- [81] E. van de Weijer-Bergsma, L. Wijnroks, and M. J. Jongmans, “Attention development in infants and preschool children born preterm: A review”, *Infant Behav Dev*, vol. 31, no. 3, pp. 333–351, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.infbeh.2007.12.003.

- [82] J. A. Johnson and R. J. Zatorre, “Attention to Simultaneous Unrelated Auditory and Visual Events: Behavioral and Neural Correlates”, *Cerebral Cortex*, vol. 15, no. 10, pp. 1609–1620, Oct. 2005, doi: 10.1093/cercor/bhi039.
- [83] S. A. Rose, J. F. Feldman, and J. J. Jankowski, “Attention and recognition memory in the 1st year of life: a longitudinal study of preterm and full-term infants.”, *Dev Psychol*, vol. 37, no. 1, pp. 135–51, Jan. 2001.
- [84] J. Colombo, “Infant Attention Grows Up: The Emergence of a Developmental Cognitive Neuroscience Perspective”, *Curr Dir Psychol Sci*, vol. 11, no. 6, pp. 196–200, Dec. 2002, doi: 10.1111/1467-8721.00199.
- [85] M. Downes, D. Kelly, K. Day, N. Marlow, and M. de Haan, “Visual attention control differences in 12-month-old preterm infants”, *Infant Behav Dev*, vol. 50, pp. 180–188, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.infbeh.2018.01.002.
- [86] Y. Sun and R. Fisher, “Object-based visual attention for computer vision”, *Artif Intell*, vol. 146, no. 1, pp. 77–123, May 2003, doi: 10.1016/S0004-3702(02)00399-5.
- [87] R. B. McCall and M. S. Carriger, “A Meta-Analysis of Infant Habituation and Recognition Memory Performance as Predictors of Later IQ”, *Child Dev*, vol. 64, no. 1, p. 57, Feb. 1993, doi: 10.2307/1131437.
- [88] S. A. Rose, J. F. Feldman, and J. J. Jankowski, “Infant visual recognition memory”, *Developmental Review*, vol. 24, no. 1, pp. 74–100, Mar. 2004, doi: 10.1016/j.dr.2003.09.004.
- [89] R. L. Fantz, “Visual Experience in Infants: Decreased Attention to Familiar Patterns Relative to Novel Ones”, *Science (1979)*, vol. 146, no. 3644, pp. 668–670, Oct. 1964, doi: 10.1126/science.146.3644.668.
- [90] R. L. Fantz, “A Method for Studying Early Visual Development”, *Percept Mot Skills*, vol. 6, no. 1, pp. 13–15, Mar. 1956, doi: 10.2466/pms.1956.6.g.13.
- [91] R. F. Caron and A. J. Caron, “Degree of stimulus complexity and habituation of visual fixation in infants”, *Psychon Sci*, vol. 14, no. 2, pp. 78–79, Feb. 1969, doi: 10.3758/BF03336439.
- [92] J. Kagan and M. Lewis, “Studies of attention in the human infant”, *Merrill Palmer Q*, vol. 11, no. 2, pp. 95–127, 1965.

- [93] D. H. Rose and A. M. Slater, “Infant recognition memory following brief stimulus exposure”, *British Journal of Developmental Psychology*, vol. 1, no. 3, pp. 221–230, Sep. 1983, doi: 10.1111/j.2044-835X.1983.tb00896.x.
- [94] S. A. Rose, J. F. Feldman, and J. J. Jankowski, “Attention and recognition memory in the 1st year of life: a longitudinal study of preterm and full-term infants.”, *Dev Psychol*, vol. 37, no. 1, pp. 135–51, Jan. 2001.
- [95] S. A. Rose, J. F. Feldman, and J. J. Jankowski, “Processing speed in the 1st year of life: A longitudinal study of preterm and full-term infants.”, *Dev Psychol*, vol. 38, no. 6, pp. 895–902, 2002, doi: 10.1037/0012-1649.38.6.895.
- [96] Nancy Bayley, *Bayley Scales of Infant and Toddler Development (3rd ed.)*. 2006.
- [97] E. H. Aylward, N. J. Minshew, K. Field, B. F. Sparks, and N. Singh, “Effects of age on brain volume and head circumference in autism”, *Neurology*, vol. 59, no. 2, pp. 175–183, Jul. 2002, doi: 10.1212/WNL.59.2.175.
- [98] L. C. Fernald, P. J. Gertler, and L. M. Neufeld, “10-year effect of Oportunidades, Mexico’s conditional cash transfer programme, on child growth, cognition, language, and behaviour: a longitudinal follow-up study”, *The Lancet*, vol. 374, no. 9706, pp. 1997–2005, Dec. 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)61676-7.
- [99] D. S. Weiss *et al.*, “Frequency and severity approaches to indexing exposure to trauma: the Critical Incident History Questionnaire for police officers.”, *J Trauma Stress*, vol. 23, no. 6, pp. 734–43, Dec. 2010, doi: 10.1002/jts.20576.
- [100] G. Ross, “Use of the Bayley Scales to Characterize Abilities of Premature Infants”, *Child Dev*, vol. 56, no. 4, p. 835, Aug. 1985, doi: 10.2307/1130095.
- [101] K. Velikos *et al.*, “Bayley-III scales at 12 months of corrected age in preterm infants: Patterns of developmental performance and correlations to environmental and biological influences”, *Res Dev Disabil*, vol. 45–46, pp. 110–119, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.ridd.2015.07.014.
- [102] Y.-T. Yu *et al.*, “A psychometric study of the Bayley Scales of Infant and Toddler Development – 3rd Edition for term and preterm Taiwanese infants”, *Res Dev Disabil*, vol. 34, no. 11, pp. 3875–3883, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.ridd.2013.07.006.
- [103] A. Moore, *Teaching and Learning*. Routledge, 2012. doi: 10.4324/9780203134061.
- [104] C. Anderson, “Presenting and Evaluating Qualitative Research”, *Am J Pharm Educ*, vol. 74, no. 8, p. 141, Oct. 2010, doi: 10.5688/aj7408141.

- [105] L. D. Vanes *et al.*, “Associations Between Neonatal Brain Structure, the Home Environment, and Childhood Outcomes Following Very Preterm Birth”, *Biological Psychiatry Global Open Science*, vol. 1, no. 2, pp. 146–155, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.bpsgos.2021.05.002.
- [106] B. Hüning *et al.*, “Relationship between brain function (aEEG) and brain structure (MRI) and their predictive value for neurodevelopmental outcome of preterm infants.”, *Eur J Pediatr*, vol. 177, no. 8, pp. 1181–1189, Aug. 2018, doi: 10.1007/s00431-018-3166-2.
- [107] V. F. Burdjalov, S. Baumgart, and A. R. Spitzer, “Cerebral Function Monitoring: A New Scoring System for the Evaluation of Brain Maturation in Neonates”, *Pediatrics*, vol. 112, no. 4, pp. 855–861, Oct. 2003, doi: 10.1542/peds.112.4.855.
- [108] M. D. Wheelock *et al.*, “Altered functional network connectivity relates to motor development in children born very preterm.”, *Neuroimage*, vol. 183, pp. 574–583, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.08.051.
- [109] J. D. Power *et al.*, “Functional network organization of the human brain.”, *Neuron*, vol. 72, no. 4, pp. 665–78, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.006.
- [110] S. Tombolini *et al.*, “Is low cerebral near infrared spectroscopy oximetry associated with neurodevelopment of preterm infants without brain injury?”, *J Perinat Med*, vol. 50, no. 5, pp. 625–629, Jun. 2022, doi: 10.1515/jpm-2021-0498.
- [111] A. C. Katheria *et al.*, “Association between early cerebral oxygenation and neurodevelopmental impairment or death in premature infants”, *Journal of Perinatology*, vol. 41, no. 4, pp. 743–748, Apr. 2021, doi: 10.1038/s41372-021-00942-w.
- [112] E. A. Verhagen *et al.*, “Cerebral oxygenation is associated with neurodevelopmental outcome of preterm children at age 2 to 3 years”, *Dev Med Child Neurol*, vol. 57, no. 5, pp. 449–455, May 2015, doi: 10.1111/dmcn.12622.
- [113] T. Alderliesten *et al.*, “Low Cerebral Oxygenation in Preterm Infants Is Associated with Adverse Neurodevelopmental Outcome”, *J Pediatr*, vol. 207, pp. 109-116.e2, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.jpeds.2018.11.038.
- [114] J. S. Horst and M. C. Hout, “The Novel Object and Unusual Name (NOUN) Database: A collection of novel images for use in experimental research”, *Behav Res Methods*, vol. 48, no. 4, pp. 1393–1409, Dec. 2016, doi: 10.3758/s13428-015-0647-3.
- [115] M.G. Saslow, “Latency for saccadic eye movement.”, *J Opt Soc Am*, 1967.

- [116] J. F. Fagan, “Memory in the infant”, *J Exp Child Psychol*, vol. 9, no. 2, pp. 217–226, Apr. 1970.
- [117] R.L. Fantz, “A Method for Studying Early Visual Development.”, *Percept Mot Skills*, vol. 6(1), pp. 13–25, 1956.
- [118] S. J. Fonda, D. G. Lewis, R. A. Vigersky, and W. Reed, “Minding the Gaps in Continuous Glucose Monitoring: A Method to Repair Gaps to Achieve More Accurate Glucometrics”, 2013. [Online]. Available: www.journalofdst.org
- [119] A. Galderisi *et al.*, “Continuous Glucose Monitoring in Very Preterm Infants: A Randomized Controlled Trial.” [Online]. Available: www.aappublications.org/news
- [120] C. Bulgarelli, C. C. J. M. de Klerk, J. E. Richards, V. Southgate, A. Hamilton, and A. Blasi, “The developmental trajectory of fronto-temporoparietal connectivity as a proxy of the default mode network: a longitudinal fNIRS investigation”, *Hum Brain Mapp*, vol. 41, no. 10, pp. 2717–2740, Jul. 2020, doi: 10.1002/hbm.24974.
- [121] J. Wang, Q. Dong, and H. Niu, “The minimum resting-state fNIRS imaging duration for accurate and stable mapping of brain connectivity network in children”, *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06340-7.
- [122] S. Brigadoi, P. Aljabar, M. Kuklisova-Murgasova, S. R. Arridge, and R. J. Cooper, “A 4D neonatal head model for diffuse optical imaging of pre-term to term infants”, *Neuroimage*, vol. 100, pp. 385–394, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.06.028.
- [123] R. Oostenveld and P. Praamstra, “The @ve percent electrode system for high-resolution EEG and ERP measurements.” [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/clinph
- [124] S. Brigadoi, D. Salvagnin, M. Fischetti, and R. J. Cooper, “Array Designer: automated optimized array design for functional near-infrared spectroscopy”, *Neurophotonics*, vol. 5, no. 03, p. 1, Sep. 2018, doi: 10.1117/1.nph.5.3.035010.
- [125] F. Scholkmann, S. Spichtig, T. Muehlemann, and M. Wolf, “How to detect and reduce movement artifacts in near-infrared imaging using moving standard deviation and spline interpolation”, *Physiol Meas*, vol. 31, no. 5, pp. 649–662, May 2010, doi: 10.1088/0967-3334/31/5/004.
- [126] M. A. Yücel, J. Selb, R. J. Cooper, and D. A. Boas, “Targeted principle component analysis: A new motion artifact correction approach for near-infrared spectroscopy”, *J Innov Opt Health Sci*, vol. 07, no. 02, p. 1350066, Mar. 2014, doi: 10.1142/S1793545813500661.

- [127] Behnam Molavi and Guy A. Dumont, “Wavelet Based Motion Artifact Removal for Functional Near Infrared Spectroscopy”, in *32nd Annual International Conference of the IEEE EMBS*, 2010.
- [128] M. Yang *et al.*, “Motion artifact correction for resting-state neonatal functional near-infrared spectroscopy through adaptive estimation of physiological oscillation denoising”, *Neurophotonics*, vol. 9, no. 04, Oct. 2022, doi: 10.1117/1.nph.9.4.045002.
- [129] J. Cousijn, M. Luijten, and S. W. Feldstein Ewing, “Adolescent resilience to addiction: a social plasticity hypothesis”, *The Lancet Child and Adolescent Health*, vol. 2, no. 1. Elsevier B.V., pp. 69–78, Jan. 01, 2018. doi: 10.1016/S2352-4642(17)30148-7.
- [130] Y. Benjamini and Y. Hochberg, “Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing”, 1995.
- [131] C. R. Pernet, R. Wilcox, and G. A. Rousselet, “Robust Correlation Analyses: False Positive and Power Validation Using a New Open Source Matlab Toolbox”, *Front Psychol*, vol. 3, 2013, doi: 10.3389/fpsyg.2012.00606.
- [132] G. A. Rousselet and C. R. Pernet, “Improving standards in brain-behavior correlation analyses”, *Front Hum Neurosci*, vol. 6, 2012, doi: 10.3389/fnhum.2012.00119.
- [133] N. Henze and B. Zirkler, “A class of invariant consistent tests for multivariate normality”, *Commun Stat Theory Methods*, vol. 19, no. 10, pp. 3595–3617, Jan. 1990, doi: 10.1080/03610929008830400.
- [134] P. J. Rousseeuw, “Least Median of Squares Regression”, *J Am Stat Assoc*, vol. 79, no. 388, p. 871, Dec. 1984, doi: 10.2307/2288718.
- [135] P. J. Rousseeuw and K. van Driessen, “A Fast Algorithm for the Minimum Covariance Determinant Estimator”, *Technometrics*, vol. 41, no. 3, p. 212, Aug. 1999, doi: 10.2307/1270566.
- [136] S. Verboven and M. Hubert, “LIBRA: a MATLAB library for robust analysis”, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 75, no. 2, pp. 127–136, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.chemolab.2004.06.003.
- [137] Wilcox R., *Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing*. Elsevier, 2012. doi: 10.1016/C2010-0-67044-1.
- [138] A. Trujillo-Ortiz, K. Barba-Rojo, L. Cupul-Magana, and R. Hernandez-Walls, “HZmvntest:Henze-Zirkler’s Multivariate Normality Test. A MATLAB file.”, 2007.

- [139] L. Skov and O. Pryds, “Capillary recruitment for preservation of cerebral glucose influx in hypoglycemic, preterm newborns: evidence for a glucose sensor?”, *Pediatrics*, vol. 90, no. 2 Pt 1, pp. 193–5, Aug. 1992.
- [140] S. Brigadoi *et al.*, “Mapping hemodynamic changes during hypoglycemia in the very preterm neonatal brain: preliminary results”, in *Diffuse Optical Spectroscopy and Imaging VII*, H. Dehghani and H. Wabnitz, Eds., SPIE, Jul. 2019, p. 13. doi: 10.1117/12.2526974.
- [141] J. M. Kerstjens, I. F. Bocca-Tjeertes, A. F. de Winter, S. A. Reijneveld, and A. F. Bos, “Neonatal Morbidities and Developmental Delay in Moderately Preterm-Born Children”, *Pediatrics*, vol. 130, no. 2, pp. e265–e272, Aug. 2012, doi: 10.1542/peds.2012-0079.
- [142] H. Zhang, Y.-J. Zhang, L. Duan, S.-Y. Ma, C.-M. Lu, and C.-Z. Zhu, “Is resting-state functional connectivity revealed by functional near-infrared spectroscopy test-retest reliable?”, *J Biomed Opt*, vol. 16, no. 6, p. 067008, 2011, doi: 10.1117/1.3591020.
- [143] H. Niu *et al.*, “Test-Retest Reliability of Graph Metrics in Functional Brain Networks: A Resting-State fNIRS Study”, *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e72425, Sep. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0072425.
- [144] W. J. Pearce, “Fetal Cerebrovascular Maturation: Effects of Hypoxia”, *Semin Pediatr Neurol*, vol. 28, pp. 17–28, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.spen.2018.05.003.
- [145] L. Vasung *et al.*, “Exploring early human brain development with structural and physiological neuroimaging”, *Neuroimage*, vol. 187, pp. 226–254, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.07.041.
- [146] Stefano Vicari and Silvia Di Vara, *Funzioni esecutive e disturbi dello sviluppo: Diagnosi, trattamento clinico e intervento educativo*. 2017.
- [147] M. Scolari, K. N. Seidl-Rathkopf, and S. Kastner, “Functions of the human frontoparietal attention network: Evidence from neuroimaging”, *Curr Opin Behav Sci*, vol. 1, pp. 32–39, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.cobeha.2014.08.003.

SITOGRAFIA

[148] Oxford English Dictionary www.oed.com

[149] <https://items.giuntipsy.it/2021/01/01/scale-bayley-iii-i-vantaggi-assessment-con-le-scale-di-sviluppo/>