

Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

**Sviluppo di un nuovo modello della cinetica
sottocutanea dell'insulina e sua incorporazione
nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1**

Laureanda:
Federica Girardi

Relatore:
Prof. Claudio Cobelli
Correlatore:
Prof.ssa Chiara Dalla Man
Ing. Michele Schiavon

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

Alla mia famiglia

Abstract

Il diabete è una tra le patologie più diffuse a livello mondiale ed è caratterizzata da un'alterazione nel sistema di regolazione glucosio-insulina portando un aumento cronico della concentrazione di glucosio nel sangue, dovuta ad un'assenza (diabete di tipo 1) o ad un'alterata (diabete di tipo 2) secrezione insulinica, con conseguenti patologie invalidanti connesse. Una componente fondamentale nella cura del diabete, specialmente nel tipo 1, consiste nella terapia insulinica sostitutiva caratterizzata da iniezioni sottocutanee di insulina esogena al fine di riportare il glucosio ematico a livelli normali. Risulta quindi fondamentale, al giorno d'oggi, la descrizione di meccanismi dell'assorbimento sottocutaneo dell'insulina al fine di ottimizzare la terapia per evitare fenomeni ipo/iperglicemici. Lo scopo di questa tesi dunque consiste nello sviluppo di un nuovo modello per la cinetica sottocutanea dell'insulina capace di caratterizzare i meccanismi di assorbimento sottocutaneo di insulina in pazienti diabetici di tipo 1. A tale scopo viene utilizzato un ricco database, proveniente da diversi protocolli sperimentali, in cui dapprima vengono analizzati i modelli presenti in letteratura fino ad oggi, evidenziandone punti di forza e di debolezza, e in un secondo momento, si passa allo sviluppo di un nuovo modello, a partire da informazioni fisiologiche, capace di descrivere correttamente i dati. Al termine, il modello sviluppato viene incorporato nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1 generando una popolazione virtuale finalizzata a migliorare le strategie di controllo nella terapia insulinica.

Indice

1	Introduzione	13
1.1	Il diabete	13
1.2	Il sistema di regolazione glucosio-insulina	16
1.3	La terapia insulinica	18
1.4	I modelli dell'assorbimento sottocutaneo di insulina in letteratura	22
1.5	Scopo della tesi	23
2	Data Base e protocolli sperimentali	25
2.1	Data base 1	25
2.1.1	Soggetti	25
2.1.2	Protocollo sperimentale	26
2.2	Data base 2	26
2.2.1	Soggetti	26
2.2.2	Protocollo sperimentale	27
2.3	Data base 3	27
2.3.1	Soggetti	27
2.3.2	Protocollo sperimentale	28
3	Modelli della cinetica sottocutanea dell'insulina	29
3.1	Modelli in letteratura	29
3.1.1	Modello <i>Dalla Man et al.</i>	29
3.1.2	Modello <i>Wilinska et al.</i>	30
3.1.3	Modello <i>Lv et al.</i>	32
3.2	Nuovi modelli sviluppati	33
3.2.1	Modello con ritardo fisico	34
3.2.2	Modello con ritardo compartimentale	35
4	Identificazione e selezione del modello	37
4.1	La stima parametrica	37
4.1.1	Informazione a priori	40
4.1.2	Informazione a posteriori	41

4.1.3	Minimizzazione della funzione obiettivo	41
4.1.4	Precisione delle stime	42
4.2	Selezione del modello	43
5	Risultati	45
5.1	Modelli in letteratura	45
5.1.1	Identificabilità	45
5.1.2	Stima parametrica	46
5.1.3	Analisi dei fit e dei residui pesati	48
5.1.4	Discussione	50
5.2	Nuovi modelli sviluppati	51
5.2.1	Identificabilità	51
5.2.2	Stima parametrica	52
5.2.3	Analisi dei fit e dei residui pesati	53
5.2.4	Discussione e selezione del modello	57
6	Incorporazione del modello ottimo nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1	59
6.1	Introduzione	59
6.2	Identificazione e risultati del modello prescelto	62
6.2.1	Identificabilità del modello con ritardo fisico	62
6.2.2	Stima parametrica	63
6.2.3	Analisi dei fit e dei residui pesati	66
6.2.4	Discussione	68
6.2.5	Generazione dei parametri di assorbimento sottocutaneo dell'insulina	68
7	Conclusioni	73
	Bibliografia	75

Elenco delle figure

1.1	Schema della struttura di un Pancreas Artificiale.	14
1.2	Stima del numero di diabetici tra 2015 e 2040 nel mondo[4].	15
1.3	Sistema di regolazione glucosio-insulina.	18
1.4	Profili della farmacocinetica di insuline standard e analoghi [6].	20
1.5	Profilo dell’analogo di insulina a confronto[15].	21
2.1	Fit del Data Base 1. La media viene riportata in rosso.	26
2.2	Fit del Data Base 2. La media viene riportata in rosso.	27
2.3	Fit del Data Base 3. La media viene riportata in rosso.	28
3.1	Modello <i>Dalla Man et al.</i>	30
3.2	Modello <i>Wilinska et al.</i>	31
3.3	Modello <i>Lv et al.</i>	32
3.4	Modello <i>Lv et al.</i> esplicito.	33
3.5	Modello con ritardo fisico.	34
3.6	Modello con ritardo compartimentale.	35
5.1	Modelli della letteratura a confronto: fit e residui pesati Data Base 1.	48
5.2	Modelli della letteratura a confronto: fit e residui pesati Data Base 2.	49
5.3	Modelli della letteratura a confronto: fit e residui pesati Data Base 3.	49
5.4	Nuovi modelli sviluppati a confronto, fit e residui pesati: Data Base1.	53
5.5	Nuovi modelli sviluppati a confronto, fit e residui pesati: Data Base2.	54
5.6	Nuovi modelli sviluppati a confronto, fit e residui pesati: Data Base3.	54
5.7	Fit medi +/-SE della fase di comparsa dell’insulina per i due nuovi modelli.	55
5.8	Fit medi +/-SE della fase di scomparsa dell’insulina per i due modelli.	56
6.1	Schema del sistema glucosio-insulina nel soggetto sano.	60
6.2	Modello compartimentale della cinetica dell’insulina plasmatica.	61
6.3	Modello della cinetica sottocutanea dell’insulina.	62
6.4	Fit e residui pesati: Modello con ritardo fisico nel simulatore UVA/-Padova del diabete di tipo 1: Data Base 1.	66

6.5	Fit e residui pesati: Modello con ritardo fisico nel simulatore UVA/- Padova del diabete di tipo 1: Data Base 2.	67
6.6	Fit e residui pesati: Modello con ritardo fisico nel simulatore UVA/- Padova del diabete di tipo 1: Data Base 3.	67
6.7	Valori di k_d nei nuovi soggetti simulati.	69
6.8	Valori di k_{a1} nei nuovi soggetti simulati.	69
6.9	Valori di k_{a2} nei nuovi soggetti simulati.	70
6.10	Valori di τ nei nuovi soggetti simulati.	70
6.11	Dati veri e dati simulati a confronto: Data Base 2.	70

Elenco delle tabelle

2.1	Soggetti Data base 1: dati demografici medi e dose di insulina media iniettata +/-SD	25
2.2	Soggetti Data base 2: dati demografici medi e dose di insulina media iniettata +/-SD	26
2.3	Soggetti Data base 3: dati demografici medi e dose di insulina media iniettata +/-SD	27
5.1	Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD): Modello <i>Dalla Man et al.</i>	46
5.2	Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD): Modello <i>Wilinska et al.</i>	47
5.3	Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD): Modello <i>Lv et al.</i>	47
5.4	Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD) Data Base 1: Modelli sviluppati a confronto.	52
5.5	Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD) Data Base 2: Modelli sviluppati a confronto.	52
5.6	Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD) Data Base 3: Modelli sviluppati a confronto.	52
6.1	Stima parametrica: Media+/- SD Data Base1.	63
6.2	Stima parametrica: Media+/- SD Data Base 2.	63
6.3	Stima parametrica: Media+/- SD Data Base 3.	63
6.4	Stima parametrica: Modello con ritardo fisico applicato al modello mono e bi-compartmentale del plasma, media +/-SD Data Base 1.	64
6.5	Stima parametrica: Modello con ritardo fisico applicato al modello mono e bi-compartmentale del plasma, media +/-SD Data Base 2.	65
6.6	Stima parametrica: Modello con ritardo fisico applicato al modello mono e bi-compartmentale del plasma, media +/-SD Data Base 3.	65

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Il diabete

Il diabete è una malattia cronica caratterizzata da un'alterata produzione o funzione dell'ormone insulina che è il principale responsabile del controllo di glucosio nel sangue. Questa alterazione provoca un aumento di glucosio nel sangue causando danni ad organi come cervello, fegato e cuore. Tale patologia si manifesta in due forme principali: il diabete di tipo I e il diabete di tipo II.

- Il diabete di tipo I (T1DM) o *insulino dipendente*, è conosciuto anche con il nome di diabete giovanile, colpisce infatti soprattutto i bambini e i giovani adolescenti anche se non è da escludere che possa essere riscontrato negli anziani a causa di una involuzione delle beta cellule-pancreatiche che, progressivamente, si atrofizzano. Solo il 10% delle persone colpite da diabete è interessato da questo tipo di patologia. Tale disturbo è causato da una disfunzione auto-immune delle beta-cellule danneggiandole a tal punto da ridurre o anche azzerare completamente, la produzione di insulina, ormone deputato alla regolazione di glucosio nel sangue. In conseguenza di ciò, il corpo non è più in grado di metabolizzare gli zuccheri introdotti attraverso l'alimentazione, che vengono così eliminati con le urine. In queste condizioni, l'organismo utilizza altri meccanismi per ricavare energia come, per esempio, il metabolismo dei grassi, portando alla produzione di corpi chetonici il cui accumulo può essere non solo dannoso ma anche letale[1]. I sintomi tipici di questa malattia sono perdita di peso, poliuria (maggiore quantità di urine), astenia (stanchezza) e polidipsia (sete). La terapia del diabete di tipo I è quindi basata su quotidiane infusioni di insulina esogene sia mediante terapie multiiniezioni di insulina (MDI) sia attraverso pompe sottocutanee di insulina (CSII). In alternativa, le possibili terapie del diabete di tipo I riguardano il trapianto di pancreas o delle isole pancreatiche, che finora han-

no però riscontrato problematiche di rigetto. Infine, numerosi studi e trials clinici sono impiegati nello sviluppo di pancreas artificiale, un dispositivo artificiale esterno in grado di svolgere una funzione analoga a quella delle beta-cellule del pancreas nei soggetti sani e di rendere normale il metabolismo del glucosio del paziente. L'idea di base è quella di avere un dispositivo impiantabile che sopperisca alle funzioni di autoanalisi e iniezioni di insulina. Esso è particolarmente vantaggioso in quanto la glicemia, rispetto ai metodi tradizionali, viene controllata secondo per secondo inducendo una maggior efficienza terapeutica. Il pancreas artificiale è composto sostanzialmente di tre parti come indicato in figura 1.1:

- Il sensore della glicemia: dispositivo per la misura in continua della glicemia.
- Il controllore: è un algoritmo di controllo che calcola la velocità di infusione di insulina e glucosio in relazione alla risposta del sensore.
- La pompa di insulina: dispositivo atto a realizzare l'infusione di insulina su comando del controllore.

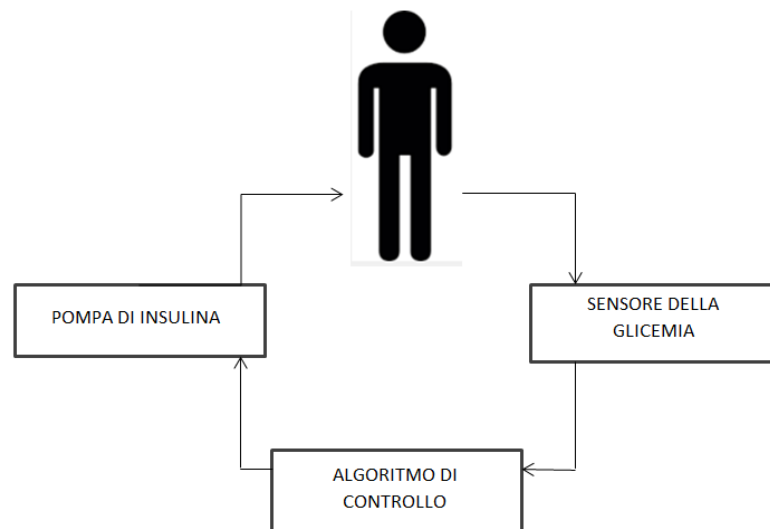


Figura 1.1: Schema della struttura di un Pancreas Artificiale.

- Il diabete di tipo II (NIDDM: non-insulin-dependent diabetes mellitus) o *insulino indipendente* è la forma di diabete più frequente e si riscontra prevalentemente in età matura anche se di recente, a causa di abitudini alimentari e stili di vita poco salutari, anche la popolazione giovanile ne viene colpita. Questa patologia può essere provocata o da un deficit di secrezione insulinica o da un insulino-resistenza. In ogni caso, questi meccanismi conducono

necessariamente ad una condizione di iperglicemia, ovvero un aumento di glucosio nel sangue. I fattori di rischio primari attribuibili all'insorgenza di questa malattia sono una combinazione di fattori modificabili (obesità, fumo, dieta, colesterolo) e non modificabili (età, genetica e gravidanza per quanto riguarda le donne). I sintomi che si presentano nel diabete di tipo II sono pressochè assimilabili a quelli del diabete di tipo I. Le cure per questa patologia sono concentrate su uno stile di vita sano. Alla base infatti c'è una dieta equilibrata seguita da attività fisica, e, se ciò non è sufficiente a riportare i valori di glicemia a valori ottimali si passa a ipoglicemizzanti orali.

Estimated number of people with diabetes worldwide and per region in 2015 and 2040 (20-79 years)

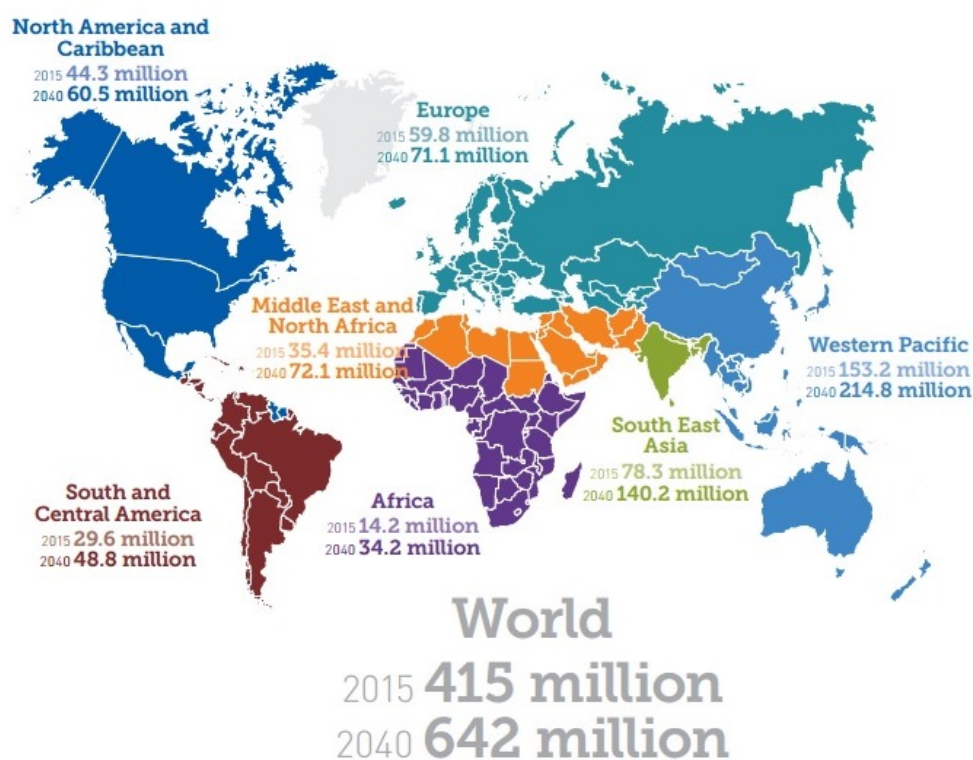


Figura 1.2: Stima del numero di diabetici tra 2015 e 2040 nel mondo[4].

A livello mondiale il diabete è considerata una vera e propria patologia in continua espansione che ad oggi, costituisce la quinta causa di morte al mondo dopo le malattie contagiose, cardiovascolari e il cancro. Nel 2013 secondo l'*International Diabetes Federation*(IDF), la popolazione mondiale contava 382 milioni di individui diabetici. Secondo dati OMS, si stima che nel 2014 i malati di diabete occupavano il 9% della popolazione adulta. La mortalità della popolazione maschile con

diabete risulta essere 1.9 volte superiore rispetto a quella non diabetica, mentre quella femminile risulta essere maggiore di circa 2.6 volte[2]. Ad essere allarmanti sono i dati futuri, secondo l'IDF infatti, il numero di malati potrebbe crescere vertiginosamente sino ad arrivare, nel 2040, a colpire un adulto su dieci causando 642 milioni di casi in tutto il mondo. Questi dati fanno riflettere sull'importanza delle campagne di sensibilizzazione, in particolare in Paesi come gli Stati Uniti, dove si calcola che oggi il 10% della popolazione fra i 20 e i 79 anni sia affetta da diabete di tipo 2. Considerando comunque anche altre aree del mondo, dove la percentuale di diabetici era trascurabile fino al 2000, ad oggi i trend di diffusione sono molto preoccupanti, a causa della trasformazione rapida degli stili di vita. Nel 2010, in Asia, la quota di diabetici di tipo 2 era già il 7,6% della popolazione e nel 2030, è previsto un aumento al 9,1%, sempre secondo le stime della IDF[3]. Ad oggi, i tre quarti delle persone con diabete, vive in paesi in via di sviluppo (Figura 1.2). Questa patologia, se non curata, può provocare complicazioni cardiache, cecità, insufficienza renale e amputazioni. A tal proposito è evidente che essa non è dannosa solo alla salute ma risulta essere anche un onere economico.

1.2 Il sistema di regolazione glucosio-insulina

Il glucosio è un monosaccaride che rappresenta una delle fonti energetiche principali per il corretto funzionamento del nostro organismo. Essendo infatti fondamentale per i muscoli, per la zona midollare del rene ed essendo l'unica risorsa energetica del cervello e dei globuli rossi, svolge un ruolo fondamentale per la sopravvivenza degli esseri umani. La produzione di glucosio nel sangue può avvenire attraverso diversi meccanismi, esso proviene infatti:

- Dall'esterno: per *assorbimento intestinale* dopo un pasto a base di carboidrati;
- Dall'interno: il glucosio-6-fosfato prodotto per *glicogenolisi* nel fegato o per *gluconeogenesi* dal metabolismo di proteine e lipidi viene trasformato in glucosio grazie ad un enzima durante il processo di *defosforilazione*.

In seguito alla produzione di glucosio dovuta per lo più al fegato, in condizioni di digiuno, e in maniera minore ma non meno importante ai reni, dopo un pasto, esso viene assorbito dai tessuti attraverso meccanismi di trasporto, talvolta mediati da ormoni. Solitamente, in riferimento ad un soggetto sano, è importante che la concentrazione di glucosio nel sangue si mantenga entro un range di 70-100 mg/dl a digiuno. Tale concentrazione, in seguito ad un pasto, può aumentare fino ad arrivare a 120-140 mg/dl dopo circa la prima ora, tornando poi molto rapidamente a livelli iniziali grazie a meccanismi di feedback responsabili della

regolazione glicemica. Questi meccanismi regolatori sono governati per lo più da due diversi tipi di ormoni, quelli *ipoglicemici* e quelli *iperghlicemici*. Tra i primi troviamo l'insulina, un ormone secreto dalle beta-cellule delle isole di Langerhans del pancreas la cui funzione primaria è quella di abbassare la glicemia inibendo la produzione di glucosio da parte del fegato e stimolandone l'utilizzazione nei tessuti periferici. Al contrario, tra gli ormoni controregolatori iperglicemici, troviamo primo tra tutti il glucagone che, secreto dalle cellule alpha del pancreas, ha la funzione di aumentare il livello di glucosio nel sangue ogni qualvolta esso scenda nel range ipoglicemico, seguito dall'epinefrina, il cortisolo e l'ormone della crescita. In questo complesso meccanismo di regolazione della glicemia entrano in gioco anche diversi tessuti ed organi che, a seconda di specifici fabbisogni e ruoli assunti in questo processo, possiamo classificare in:

- glucosio-dipendenti: sistema nervoso centrale ed eritrociti. Essi necessitano in modo costante di glucosio per la sopravvivenza;
- insulino-dipendenti: muscoli, cuore, tessuto adiposo. Essi metabolizzano il glucosio in eccesso rispetto il fabbisogno dei tessuti insulino-dipendenti, utilizzano quindi il glucosio in modo fasico, in dipendenza dall'insulina circolante;
- gluco-sensori: fegato, beta-cellule pancreatiche e ipotalamo. Essi sono in grado di percepire il glucosio circolante e in conseguenza a ciò preparano un'appropriata risposta secretoria.
- glucoveri: intestino e reni. Si occupano dell'ingresso (intestino) e del rientro (reni) del glucosio nel sangue[5].

Il sistema di regolazione glucosio-insulina è un sistema ad anello chiuso che mira a mantenere i valori di glicemia all'interno di un certo range. Come si vede dalla figura 1.3 dopo un pasto a base di carboidrati, la concentrazione plasmatica di glucosio aumenta, di conseguenza, le beta-cellule del pancreas secernono una maggior quantità di insulina, che conseguentemente stimola l'utilizzazione del glucosio e inibisce la sua produzione endogena da parte del fegato, così da riportare la glicemia ad un livello nella norma.

Nei pazienti diabetici però accade che la funzione delle beta-cellule venga alterata. In essi infatti, l'ormone insulina non viene prodotto (diabetici di tipo 1) o parzialmente prodotto (diabetici di tipo 2), provocando gravi conseguenze. Per questo motivo risulta necessaria una terapia insulinica capace di sostituire (T1D), o comunque aiutare (fasi avanzate di T2D), il normale sistema di regolazione.

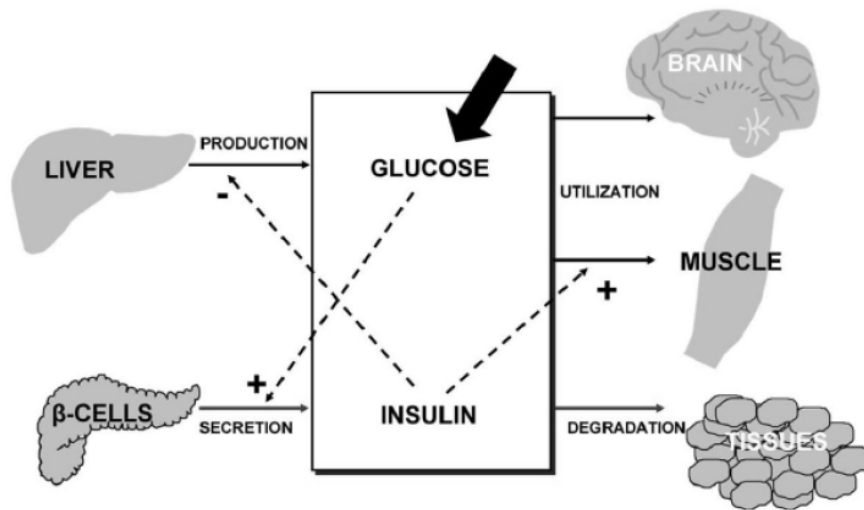


Figura 1.3: Sistema di regolazione glucosio-insulina.

1.3 La terapia insulinica

L'ormone insulina, secreto dalle beta-cellule del pancreas, è come già detto, uno degli elementi fondamentali per la regolazione del metabolismo del glucosio. Tale ormone nei pazienti diabetici non viene prodotto, o in modo assoluto (diabetici di tipo I) o relativo (diabetici di tipo II) provocando diversi danni all'organismo quali:

- danni agli organi: aumenta il rischio di ictus, cecità, amputazione degli arti inferiori, attacco cardiaco;
- danni ai nervi con conseguente formicolio e intorpidimento di arti superiori e inferiori;
- danni al sistema circolatorio favorendo l'ostruzione di arterie o vasi che portano il sangue dal cuore al resto dell'organismo.

Lo scopo della terapia del diabete, e, in particolar modo, in pazienti affetti da diabete di tipo I, è dunque quello di permettere un ripristino a livelli più fisiologici possibili di glucosio nel sangue.

Lo studio dell'insulina si protrae da oltre 80 anni ed è in continua evoluzione anche grazie allo sviluppo tecnologico. Grazie alla scoperta della possibilità di somministrare insulina sottocutanea, il diabete circa a metà del Novecento passò da essere una malattia mortale ad una malattia controllabile.

Per la cura del diabete di tipo 1 esistono svariate tipologie di insulina sul mercato che si differenziano principalmente sulla base del tempo di latenza (intervallo tra somministrazione ed inizio dell'effetto terapeutico ipoglicemizzante), tempo di picco (intervallo tra somministrazione e massimo effetto ipoglicemizzante) e tempo d'azione (intervallo tra somministrazione e scomparsa dell'effetto). L'alba della cura contro il diabete vedeva l'utilizzo di insuline bovine e porcine che molto spesso inducevano a reazioni allergiche[6]. L'idea di creare analoghi di insulina è nata negli anni '80 dal momento in cui era forte non solo il bisogno di ridurre i rischi e il numero di iniezioni giornaliere ma anche il bisogno di migliorare la cinetica di assorbimento sottocutaneo di insulina esogena rendendola quanto più simile a quella umana. Gli analoghi sono molecole derivate da batteri modificati a livello genetico che hanno la capacità di sintetizzare insulina umana. Le strutture proteiche dell'insulina prodotte da questi batteri vengono poi modificate, con la tecnica del DNA ricombinante, nella loro struttura primaria al fine di ottenere un assorbimento ultrarapido dopo un'iniezione sottocutanea o ultralento per garantire un'azione prolungata della stessa. Grazie al progresso delle tecniche farmaceutiche, oggi un paziente diabetico dispone di vari tipi di insulina:

- Analoghi ad azione rapida: utilizzati solitamente appena prima di un pasto per il controllo della glicemia post-prandiale e nelle terapie con microinfusione sia per fabbisogno prandiale che basale, consentono al paziente di far fronte a variazioni inaspettate nella sua *routine*. La loro azione ha effetto dopo 10-15 minuti dall'iniezione, raggiungono il picco di 30-60 minuti e hanno una durata di circa 4 ore. Esse sono:
 - Lispro: è un'insulina in cui sono stati invertiti gli amminoacidi in posizione B28 e B29 (catena B), passando quindi dalla fisiologica sequenza Pro-Lis all'analogo Lis-Pro. Essa differisce dall'insulina regolare grazie alla capacità di dissociarsi rapidamente in monomeri all'interno del tessuto sottocutaneo;
 - Aspart: è un'insulina in cui viene sostituito l'amminoacido prolina in posizione B28 con acido aspartico;
 - Glulisina: è un'insulina in cui avviene una doppia sostituzione. L'amminoacido prolina in posizione B28 viene sostituito con glutammato e l'acido aspartico in posizione B3 viene sostituito con lisina[7].
- Insulina ad azione rapida (regolare): utilizzata soprattutto prima dell'avvento degli analoghi ad azione rapida, circa 30 minuti prima del pasto per controllare l'iperglicemia provocata dall'assunzione di cibo o in concomitanza di picchi iperglicemici. Agisce solitamente dopo 30 minuti dalla somministrazione e il suo effetto scompare dopo 4-8 ore. Questo tipo di insulina presenta

però dei limiti: il lento inizio dell'attività è un grosso inconveniente per il paziente che deve somministrare la dose 30 minuti prima del pasto, inoltre la lunga durata d'azione porta ad un potenziale rischio di ipoglicemia postprandiale tardiva (4-6ore) o iperglicemia post prandiale.

- Insulina lenta e protamina: l'insulina lenta ha effetto dopo un paio d'ore dalla somministrazione e, grazie alla presenza di zinco al suo interno ha una durata di quasi un'intera giornata (18-24 ore) con un picco attorno alle 6-12 ore. L'insulina con protamina invece, agisce in modo simile all'insulina lenta a causa della presenza di protamina al suo interno che ne rallenta l'azione. Essa agisce infatti dopo 2-4 ore e ha un picco d'azione dopo 6-8 ore dall'iniezione con una durata di circa 12-15 ore totali.
- Insulina ultralenta: come si intuisce dal nome essa presenta, ancora una volta a causa di zinco al suo interno, un'azione ritardata. Il tempo di latenza raggiunge infatti le 4-6 ore e il picco si verifica attorno a 8-15 ore, con una conseguente scomparsa attorno le 18-24 ore.
- Analogo ad azione ultralento: Insulina glargine. Essa ha un tempo di latenza di 4-6 ore, ha una durata maggiore a 24 ore ed è caratterizzata dall'assenza di picco, la sua attività si mantiene dunque costante per tutto il tempo.

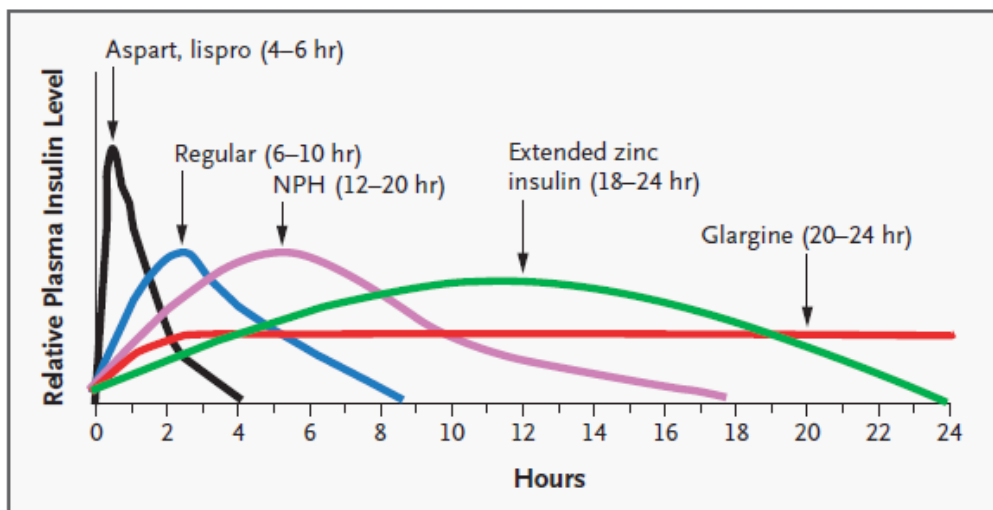


Figura 1.4: Profili della farmacocinetica di insuline standard e analoghi [6].

L'assorbimento relativamente lento dell'insulina regolare è dovuto al fatto che quando gli atomi di zinco vengono aggiunti alla soluzione dimerica che forma l'insulina regolare, si formano degli esameri. Queste grandi molecole si diffondono

lentamente nella circolazione mentre i dimeri e monomeri di insulina vengono assorbiti più rapidamente[6]. In riferimento a questo andamento, abbiamo visto come gli analoghi di insulina presentino delle modifiche strutturali che gli consentono di avere una cinetica più fisiologica rispetto alle insuline precedenti. Essi infatti, come si può notare in figura 1.5, riproducono abbastanza fedelmente la risposta secretoria insulinica al pasto, con un picco precoce dopo l'iniezione sottocutanea e un esaurimento abbastanza rapido. I vantaggi di questi analoghi sono quindi molteplici, tra questi: la flessibilità di somministrazione (prima, durante, dopo i pasti), il minor rischio di ipoglicemia tra i pasti e un miglior controllo della glicemia post-prandiale.

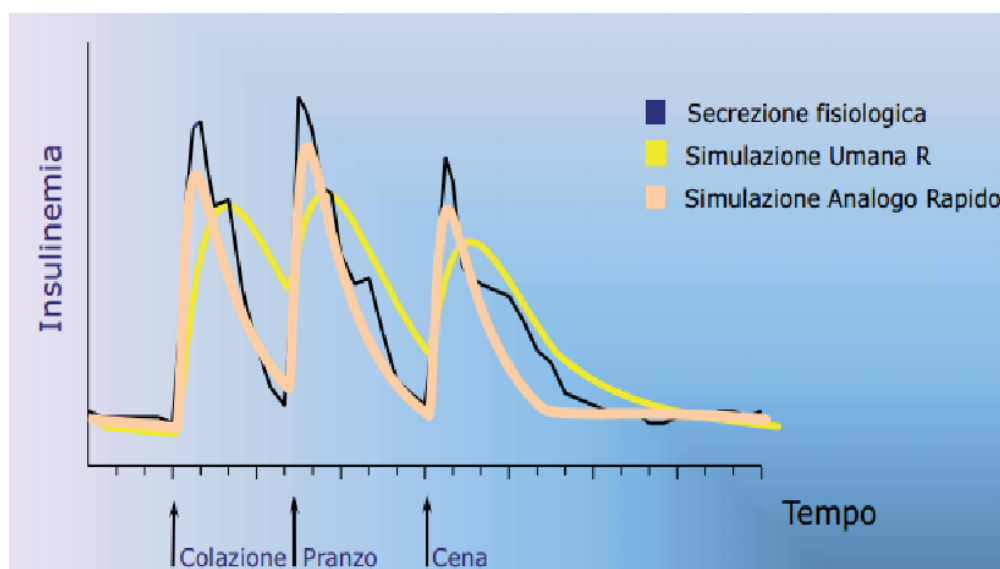


Figura 1.5: Profilo dell'analogo di insulina a confronto[15].

Nel diabete di tipo 1 è assolutamente indispensabile una terapia insulinica sostitutiva capace di riprodurre sia nelle fasi postprandiali che in quelle a digiuno, le concentrazioni fisiologiche di insulina similmente ad un soggetto sano. Oggigiorno, le terapie convenzionali si dividono in:

Multiple daily injection (MDI) Questa terapia consiste in una serie di iniezioni multiple giornaliere somministrate per via sottocutanea prima dei pasti a cui si associa un'insulina ad azione rapida per compensare l'assorbimento di carboidrati del pasto, e prima di coricarsi, a cui si associa un'insulina ad azione lenta per soddisfare il fabbisogno insulinico basale. Le dosi di insulina somministrate vengono calcolate in funzione del pasto e in funzione del monitoraggio SMBG (self monitoring blood glucose) da parte del paziente stesso. I limiti della terapia

multiiniettiva sono il fatto che essa, come dice il nome, prevede infusioni multiple (almeno 4 al dì) e non permette di modulare il fabbisogno insulinico basale in funzione dello stile di vita del paziente (dieta, esercizio..).

Sensor-augmented pump (SAP) Negli anni è stato dimostrato come la gestione intensiva del diabete di tipo 1 permetta di prevenire e/o rallentare le complicanze correlate alla malattia. A tal proposito la ricerca si è rivolta verso lo sviluppo di sistemi semi-integrati *open-loop* per la terapia insulinica. Il sistema SAP unisce due diverse tecnologie: il sistema di infusione continua di insulina per via sottocutanea (CSII) e il sistema per il monitoraggio continuo della glicemia (CGM). La terapia insulinica necessita della supervisione del paziente stesso che regola direttamente i valori di insulina che erogherà poi la pompa sottocutanea, sfruttando anche le informazioni del sensore del monitoraggio continuo di glucosio. Contrariamente alla terapia MDI, che utilizza diverse tipologie di insulina (ad azione rapida o lenta a seconda delle necessità), il microinfusore in dotazione alla SAP utilizza solo analoghi di insulina ad azione rapida, coprendo l'intero fabbisogno insulinico giornaliero mediante boli pasto e infusione basale con microboli, in modo da simulare la risposta insulinica di un soggetto sano. Questo sistema ha dimostrato la sua efficacia in particolare in pazienti pediatriche in cui la gestione della malattia risulta solitamente complessa. Rispetto alla terapia MDI inoltre, la terapia SAP risulta avere una maggior riduzione della HbA1c, minor tempo passato in iperglicemia, minor stress legato al diabete e maggior soddisfazione per il trattamento.

In definitiva si ha che, per sopperire all'inattività, totale o parziale delle beta-cellule pancreatiche, si ricorre alla terapia insulinica. Nelle attuali terapie, come MDI e SAP, vengono somministrati analoghi rapidi di insulina per via sottocutanea. A tal proposito, diventa necessario sviluppare dei modelli che descrivano fisiologicamente i meccanismi di assorbimento dell'insulina nel sottocute al fine di ottimizzare la terapia insulinica stessa.

1.4 I modelli dell'assorbimento sottocutaneo di insulina in letteratura

Come anticipato precedentemente nella trattazione delle terapie, è stata dimostrata la necessità di un trattamento intensivo sottocutaneo al fine di ritardare o comunque ridurre le complicanze nei pazienti affetti da diabete di tipo 1 (IDDM). A questo va unito il bisogno di monitorare sistematicamente la terapia insulinica al fine di evitare eventi ipoglicemici. In questo contesto diventa importante il ruolo

di modelli di simulazione capaci di fornire un aiuto nello sviluppo dei sensori, nell'analisi dei dati e nella scelta delle decisioni da prendere per garantire le migliori strategie di controllo nella terapia.

Una componente fondamentale dei modelli di simulazione nei pazienti diabetici di tipo 1 è la descrizione del trasporto dell'insulina dal sito di iniezione al sangue che risulta essere di supporto nelle decisioni cliniche e parte integrata di piattaforme in silico atte allo sviluppo e al settaggio di strategie di somministrazione insulinica per pazienti affetti da diabete. Questo processo non è semplice, è infatti determinato da molti fattori quali lo stato di associazione dell'insulina, la quantità di volume iniettato, il sito d'iniezione e la profondità stessa dell'iniezione, nonché dal tessuto e dal flusso sanguigno del paziente. In generale risulta complesso avere una descrizione quantitativa dell'assorbimento di insulina, cosa che sarebbe però importante al fine di garantire un buon supporto decisionale alla terapia convenzionale nei IDDM. A tal fine, negli anni, sono stati proposti diversi modelli macroscopici in grado di descrivere, almeno in parte, il processo di assorbimento dell'insulina. Ad oggi, i modelli presenti in letteratura si differenziano principalmente nella descrizione della fase di assorbimento, mentre la cinetica del plasma viene approssimata ad un singolo compartimento, plausibile date le lente variazioni di cinetica dopo l'iniezione [8]. In Nucci *et al.* è riportata una *review* dei modelli sviluppati fino ad oggi.

1.5 Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è quello di sviluppare ed identificare un nuovo modello della cinetica dell'insulina sottocutanea. A tale scopo, vengono utilizzati i profili di insulina plasmatica provenienti da un vasto dataset composto da 117 soggetti diabetici di tipo 1 ottenuti da diversi protocolli sperimentali e campionati con elevata frequenza di campionamento, sottoposti ad un bolo sottocutaneo di analogo rapido di insulina. Una serie di nuovi modelli vengono proposti e confrontati con quelli presenti in letteratura e il modello ottimo viene scelto in base alla bontà nella predizione dei profili di insulina e in base alla precisione e alla variabilità dei parametri ottenuti. Il modello ottimo scelto, infine, viene incorporato nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1 e la distribuzione congiunta dei parametri ottenuti verrà utilizzata per aggiornare la popolazione virtuale.

Nel capitolo 2 vengono descritti i tre data base e i rispettivi protocolli sperimentali impiegati per testare i modelli della letteratura e quelli nuovi.

Nel capitolo 3 vengono descritti i modelli presenti in letteratura e i nuovi modelli creati per la descrizione della cinetica sottocutanea dell'insulina.

Il capitolo 4 è dedicato alla descrizione dei metodi di identificazione del modello partendo dai dati sperimentali e le diverse metodologie adottate.

Nel capitolo 5 vengono presentati i risultati ottenuti, dall'analisi dei modelli in letteratura e dei nuovi modelli della cinetica dell'insulina, fino alla scelta del modello ottimo.

Nel capitolo 6 viene descritta la procedura di incorporazione del modello nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1 e la generazione di una popolazione virtuale.

Il capitolo 7 è infine dedicato alla discussione dei risultati ottenuti.

Capitolo 2

Data Base e protocolli sperimentali

In questa tesi sono stati utilizzati tre database relativi a diverse sperimentazioni cliniche. I tre database sono costituiti rispettivamente da 37 soggetti il primo, 38 soggetti il secondo, e 42 soggetti il terzo. Tutti i soggetti sono affetti da diabete di tipo I e sono stati sottoposti a periodiche condizioni di stato basale e un bolo sottocutaneo di insulina opportunamente compensato con i diversi protocolli sperimentali. Si analizzano di seguito le caratteristiche dei soggetti e il relativo protocollo sperimentale.

2.1 Data base 1

2.1.1 Soggetti

Il database 1 consta di 37 soggetti di sesso maschile affetti da diabete di tipo I di un età compresa tra i 18 e 64 anni e un indice di massa corporea (BMI) compreso tra i 18.5 e i 28.0 kg/m² (Tabella 2.1).

Età (anni)	Altezza (cm)	Peso (kg)	Dose (U)
46 +/-11	179 +/-5	79 +/-7	15,95 +/-1.5

Tabella 2.1: Soggetti Data base 1: dati demografici medi e dose di insulina media iniettata +/-SD

2.1.2 Protocollo sperimentale

Secondo il protocollo sperimentale tutti i soggetti, a tempo zero ($t=0$), sono stati sottoposti ad un clamp euglicemico con iniezione sottocutanea di analogo rapido di insulina di 0.2 U/kg e infusione di glucosio per mantenere la glicemia a circa 100 mg/dl. Prima dell'esperimento i soggetti sono stati sottoposti ad un'infusione endovenosa di insulina al fine di portare i soggetti ad uno stato glicemico basale (circa 100 mg/dl). Per alcuni soggetti è stato possibile identificare un effetto di *carry-over*, ossia, una concentrazione di insulina nel plasma diversa da zero a tempo $t=0$. Per questo protocollo, la soglia di sensibilità della misurazione di concentrazione dell'insulina nel plasma è pari a $5.5 \mu\text{U}/\text{mL}$, quindi tutti i valori sotto tale soglia vengono considerati nulli.

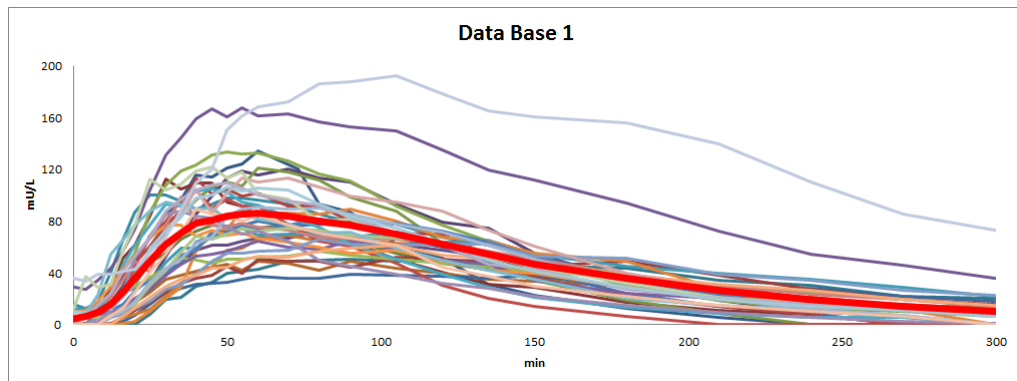


Figura 2.1: Fit del Data Base 1. La media viene riportata in rosso.

2.2 Data base 2

2.2.1 Soggetti

Il database 2 è costituito da 38 soggetti affetti da diabete di tipo I di età media di 44 anni e peso medio di circa 81 kg (Tabella 2.2).

Età (anni)	Altezza (cm)	Peso (kg)	Dose (U)
43 +/-12	180 +/-8	81 +/-9	16 +/-1.9

Tabella 2.2: Soggetti Data base 2: dati demografici medi e dose di insulina media iniettata +/-SD

2.2.2 Protocollo sperimentale

Secondo il protocollo sperimentale tutti i soggetti, a tempo zero ($t=0$), sono stati sottoposti ad un meal standard (80g) con iniezione sottocutanea di analogo rapido di 0.2 U/kg, e, in caso di fenomeni ipoglicemici, è stata somministrata una dose di carboidrati opportuna. Come nel caso precedente, prima dell'esperimento è stata infusa insulina endovena per regolare la glicemia nel sangue. L'insulina somministrata prima dell'inizio dell'esperimento in questo protocollo, contrariamente al precedente, non è rilevabile nella misura evitando l'effetto del *carry-over*. Analogamente a quanto fatto in precedenza, anche in questo protocollo, la soglia di sensibilità della misurazione di concentrazione dell'insulina nel plasma è pari a 5.5 $\mu\text{U/mL}$, quindi tutti i valori sotto tale soglia vengono considerati nulli.

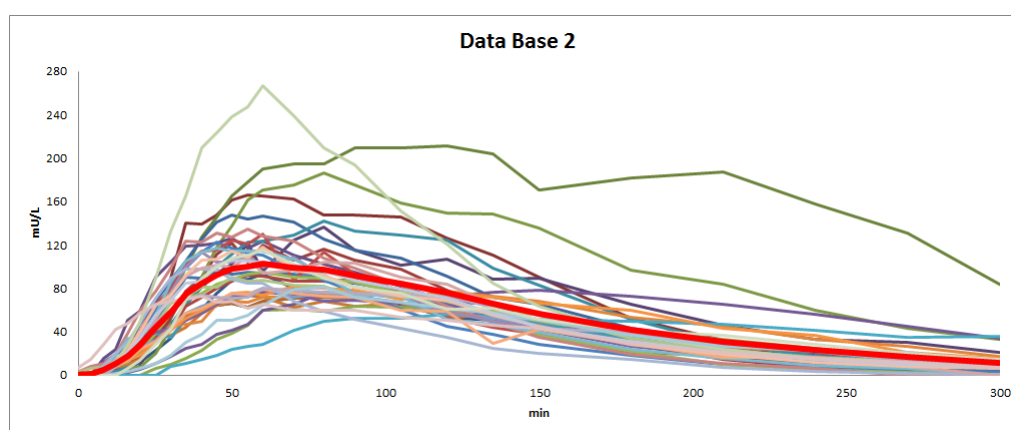


Figura 2.2: Fit del Data Base 2. La media viene riportata in rosso.

2.3 Data base 3

2.3.1 Soggetti

Il database 3 è composto da 42 soggetti (di cui 21 di sesso femminile) affetti da diabete di tipo I di età media di 43 anni (tra i 21 e 65 anni) e con indice medio di massa corporea è 24.1(20-28) kg/m^2 (Tabella 2.3).

Età (anni)	Altezza (cm)	Peso (kg)	Dose (U)
42 +/-10	174 +/-8	73 +/-10	12

Tabella 2.3: Soggetti Data base 3: dati demografici medi e dose di insulina media iniettata +/-SD

2.3.2 Protocollo sperimentale

Secondo il protocollo sperimentale tutti i soggetti, a tempo zero ($t=0$), sono stati sottoposti a clamp euglicemico con un'iniezione sottocutanea di analogo rapido di insulina di 12 U e infusione di glucosio per mantenere la glicemia intorno a 100mg/dl. Anche in questo caso, prima dell'esperimento, i soggetti sono stati sottoposti ad un'infusione endovenosa di insulina per portare i soggetti ad uno stato glicemico basale (circa 100 mg/dl). La soglia di sensibilità della misurazione di concentrazione dell'insulina nel plasma in questo caso è pari a 2.5 mU/L, quindi tutti i valori sotto tale soglia vengono considerati nulli.

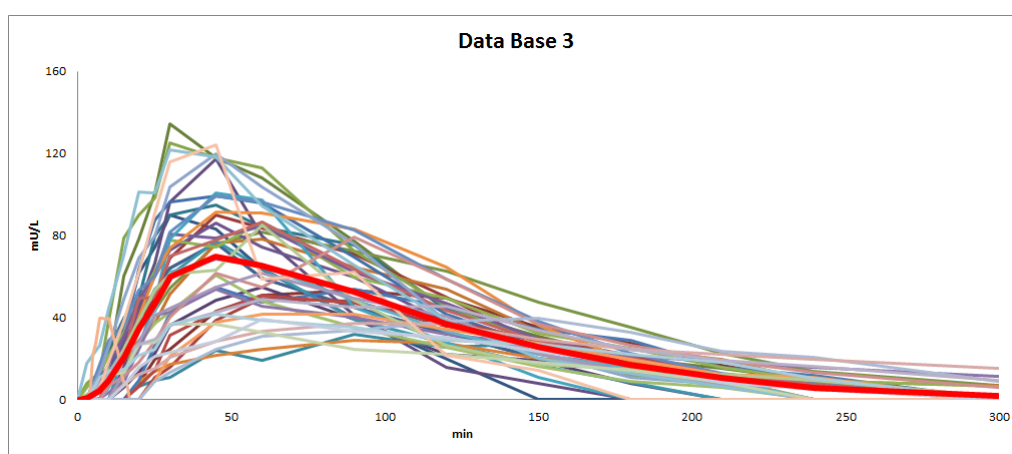


Figura 2.3: Fit del Data Base 3. La media viene riportata in rosso.

Capitolo 3

Modelli della cinetica sottocutanea dell'insulina

Come abbiamo visto nel capitolo introduttivo, negli anni sono stati molti i tentativi di creare modelli in grado di descrivere la cinetica dell'assorbimento sottocutaneo di insulina al fine di ottenere una descrizione qualitativa e quantitativa che potesse dare un forte contributo decisionale nella terapia insulinica. Di seguito verranno presentati dapprima i modelli sviluppati fino ad oggi in letteratura e successivamente verranno descritti i nuovi modelli, creati nel tentativo di migliorare la descrizione dell'assorbimento sottocutaneo dell'insulina.

Tutti i modelli considerati descrivono la cinetica sottocutanea, mentre quella plasmatica, viene descritta da un modello monocompartimentale lineare.

3.1 Modelli in letteratura

Iniziamo la trattazione concentrandoci sui modelli di letteratura più recenti: *Dalla Man et al.*, *Wilinska et al.* e *Lv et al.*

3.1.1 Modello *Dalla Man et al.*

É un modello lineare bicompartimentale costituito da due compartimenti che descrivono la frazione di insulina non-monomerica e la frazione di insulina monomerica nel sottocute[10]. Il modello presenta la struttura indicata in figura 3.1. Relativamente ad esso, le equazioni che lo descrivono risultano essere:

$$\begin{aligned} \dot{I}_{sc1}(t) &= -(k_d + k_{a1})I_{sc1}(t) + u(t) & I_{sc1}(0) &= I_{sc1ss} \\ \dot{I}_{sc2}(t) &= k_d I_{sc1}(t) - k_{a2} I_{sc2}(t) & I_{sc2}(0) &= I_{sc2ss} \end{aligned} \quad (3.1)$$

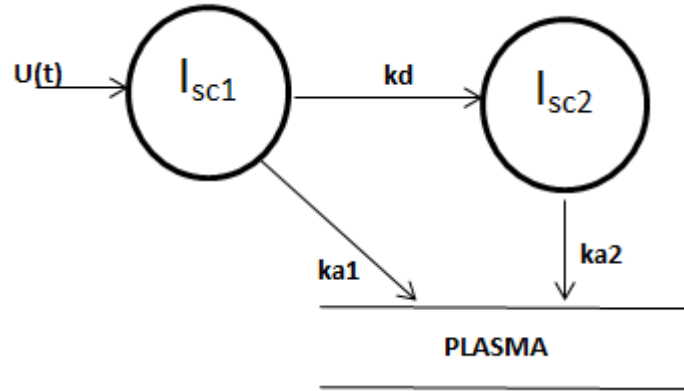


Figura 3.1: Modello *Dalla Man et al.*

con I_{sc1} e I_{sc2} rispettivamente quantità di insulina non monomerica e monomerica nel sottocute, $u(t)$ (U/min) dose esogena di insulina iniettata, $k_d(\text{min}^{-1})$ coefficiente indice della velocità di dissociazione dell'insulina da non monomerica a monomerica, $k_{a1}(\text{min}^{-1})$ costante di velocità di assorbimento sottocutaneo di insulina non monomerica e $k_{a2}(\text{min}^{-1})$ costante di velocità di assorbimento sottocutaneo di insulina monomerica. Il flusso R_i di comparsa dell'insulina nel plasma è quindi dato da:

$$R_i(t) = k_{a1}I_{sc1}(t) + k_{a2}I_{sc2}(t) \quad (3.2)$$

Tale modello è stato impiegato nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1 ed è utilizzato come supporto decisionale per l'ottimizzazione delle terapie insuliniche. È stato inoltre sviluppato a partire da informazioni a priori sulla cinetica di insulina regolare.

3.1.2 Modello *Wilinska et al.*

Oltre al precedente, analizzando altri studi in letteratura, è stato selezionato il modello di *Wilinska et al.*[11]. Tale modello considera una degradazione locale di insulina nel sito di iniezione. Il processo di degradazione di insulina è stato implementato con la cinetica di Michaelis-Menten. Fin da subito si notano però, anche per questo modello, delle problematiche: una prima osservazione va fatta riguardo il metodo utilizzato per l'identificazione del modello a priori, e in secondo luogo si pone l'attenzione sul numero di campioni disponibili per il test. Per quanto riguarda il primo punto, dall'articolo si evince che l'identificazione è stata fatta utilizzando il metodo dell'*iterative two-stage*, dunque aggiunge già da subito dei prior, per quanto riguarda invece i fit ottenuti, essi risultano sì avere un buon

CAPITOLO 3. MODELLI DELLA CINETICA SOTTOCUTANEA
DELL'INSULINA

andamento, ma questo, come vedremo è solo dovuto al fatto che i dati su cui è stato fatto l'esperimento avevano un campionamento troppo rado, era infatti presente un campione ogni 60 minuti, range eccessivo per testare un buon modello che necessita invece una conoscenza sull'andamento dei dati a tempi più ravvicinati possibili. Il modello è stato originariamente testato su insulina di tipo Lispro somministrata con terapia continua (CSII) e identificato con tecnica *iterative two-stage*(ITS) in 7 soggetti diabetici di tipo 1.

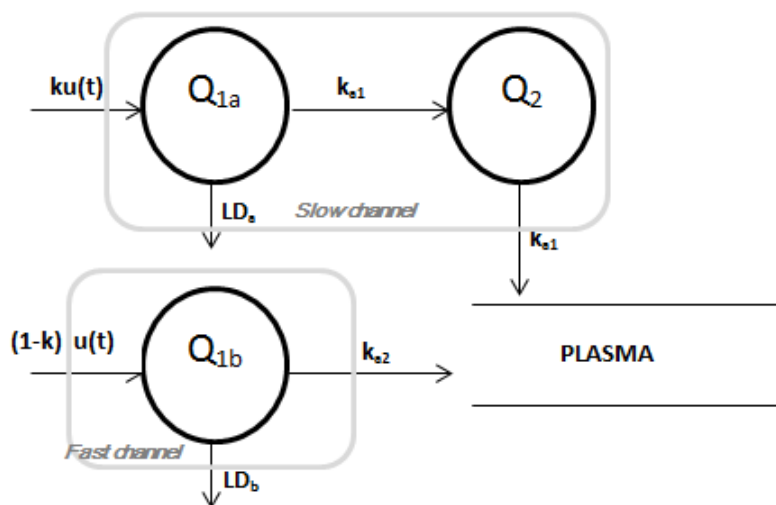


Figura 3.2: Modello *Wilinska et al.*.

La sua struttura indicata in figura 3.2 viene descritta dalle seguenti equazioni:

$$\begin{aligned}
 \dot{Q}_{1a}(t) &= ku - k_{a1}Q_{1a} - LD_a \\
 \dot{Q}_{1b}(t) &= (1-k)u - k_{a2}Q_{1b} - LD_b \\
 \dot{Q}_2(t) &= k_{a1}Q_{1a} - k_{s1}Q_2 \\
 LD_a &= V_{MAX,LD}Q_{1a}/(k_{M,LD} + Q_{1a}) \\
 LD_b &= V_{MAX,LD}Q_{1b}/(k_{M,LD} + Q_{1b})
 \end{aligned} \tag{3.3}$$

Questo modello, a differenza del precedente, è costituito da due canali di assorbimento, uno lento e uno veloce, e considera una degradazione locale di insulina. Il canale lento, composto dai due compartimenti Q_{1a} e Q_2 , con coefficiente $k_{a1}(min^{-1})$ di assorbimento di insulina a scambio lento, mentre il canale veloce è determinato dal compartimento Q_{1b} , con corrispondente coefficiente $k_{a2}(min^{-1})$ di assorbimento insulinico a scambio veloce. Il coefficiente k (%) indica la partizione della dose $u(t)$ (U/min) iniettata tra i due compartimenti Q_{1a} e Q_{1b} d'ingresso. Il

processo di degradazione locale è descritto da una cinetica di Michaelis-Menten con $V_{MAX}(mUmin^{-1})$ e $K_M(mU)$ che influiscono sulle uscite $LD_a(mUmin^{-1})$ dal compartimento Q_{1a} e $LD_b(mUmin^{-1})$ dal compartimento Q_{1b} . Il flusso di comparsa dell'insulina nel plasma è quindi data da:

$$R_i(t) = k_{a1}Q_2 + k_{a2}Q_{1b} \quad (3.4)$$

3.1.3 Modello *Lv et al.*

In questo lavoro viene infine analizzato un ultimo modello proveniente dalla letteratura. Il modello scelto da *Lv et al.* in [9]. É da sottolineare fin da subito però, come questo modello, presenta un numero elevato di compartimenti senza un corrispettivo significato fisiologico ed alcuni parametri sono stati fissati senza una corrispettiva informazione a priori. Il modello presenta la struttura indicata in figura 3.3. Le due funzioni di trasferimento TF_1 e TF_2 che lo compongono sono date dalle:

$$TF_1 = \left(\frac{b_1}{s + b_1}\right)^2 \quad e \quad TF_2 = \left(\frac{b_2}{s + b_2}\right)^{a_2} \quad (3.5)$$

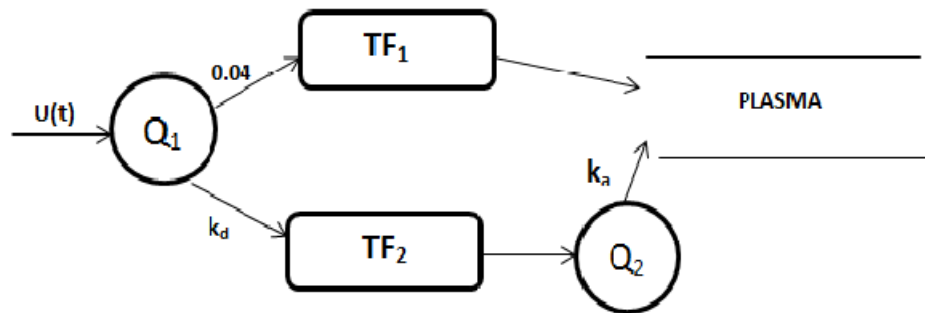


Figura 3.3: Modello *Lv et al.*

Dall'analisi delle queste funzioni di trasferimento è evidente come esse sottointendano una serie di compartimenti, in particolare, TF_1 è una catena di due compartimenti, mentre TF_2 è una catena composta da un numero di a_2 compartimenti che varia da soggetto a soggetto (figura 3.4).

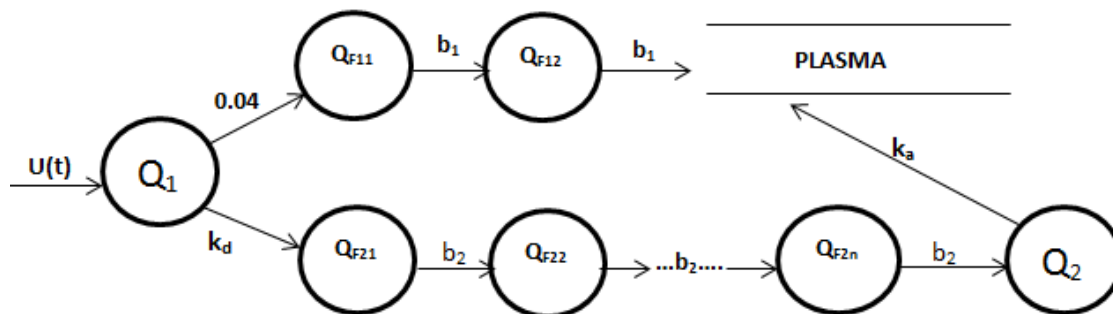


Figura 3.4: Modello *Lv et al.* esplicito.

Le equazioni che descrivono il modello sono quindi date da:

$$\begin{aligned}
 \dot{Q}_1(t) &= -0.04Q_1 - k_d Q_1 + u(t) \\
 \dot{Q}_{F11}(t) &= 0.04Q_1 - b_1 Q_{F11} \\
 \dot{Q}_{F12}(t) &= b_1 Q_{F11} - b_1 Q_{F12} \\
 \dot{Q}_{F21}(t) &= k_d Q_1 - b_2 Q_{F21} \\
 &\dots\dots\dots \\
 \dot{Q}_{F22}(t) &= b_2 Q_{F21} - b_2 Q_{F22} \\
 \dot{Q}_{F2n}(t) &= b_2 Q_{F2n-1} - b_2 Q_{F2n} \\
 \dot{Q}_2(t) &= b_2 Q_{F2n} - k_a Q_2
 \end{aligned} \tag{3.6}$$

con $b_1(\text{min}^{-1})$ e $b_2(\text{min}^{-1})$ coefficienti di assorbimento insulinico relativi rispettivamente alle funzioni di trasferimento TF_1 e TF_2 , $k_d(\text{min}^{-1})$ coefficiente di diffusione tra l'insulina nel sito di iniezione e la catena di compartimenti più 'lenta', $k_a(\text{min}^{-1})$ costante di assorbimento insulinico. L'insulina viene iniettata con dose $U(t)$ (U/min) nel compartimento Q_1 . Il parametro 0.04 tra il compartimento rappresentante il sito di iniezione e la catena di due compartimenti, è fissato *ad hoc*[9], mentre il numero a_2 di compartimenti viene calcolato iterativamente per ogni soggetto minimizzando la funzione obiettivo. Il flusso di comparsa dell'insulina nel plasma è dato da:

$$R_i(t) = b_1 Q_{F12} + k_a Q_2 \tag{3.7}$$

3.2 Nuovi modelli sviluppati

Dopo aver analizzato i modelli precedenti ed averne analizzato le caratteristiche, si è deciso di progettare nuovi modelli al fine di ottenere una miglior descrizione

dell'assorbimento insulinico sottocutaneo. I nuovi modelli sviluppati hanno come base comune il modello *Dalla Man et al.* a cui è stato aggiunto un ritardo fisico nell'assorbimento sottocutaneo dell'insulina o una catena di compartimenti per permettere di descrivere meglio i dati sperimentali di analogo rapido di insulina. Si è deciso di mantenere la struttura del modello di *Dalla Man et al.* per le sue proprietà di semplicità e identificabilità a priori e si è aggiunta la componente di ritardo nell'andamento perchè, ad una prima analisi, si è visto un ritardo nella comparsa dell'insulina nel plasma probabilmente dovuta a fenomeni di diffusione nel tessuto sottocutaneo[14].

3.2.1 Modello con ritardo fisico

Il modello, come si può notare in figura 3.5 risulta avere una struttura identica al modello del simulatore della letteratura, con l'aggiunta di un ritardo fisico τ nell'ingresso.

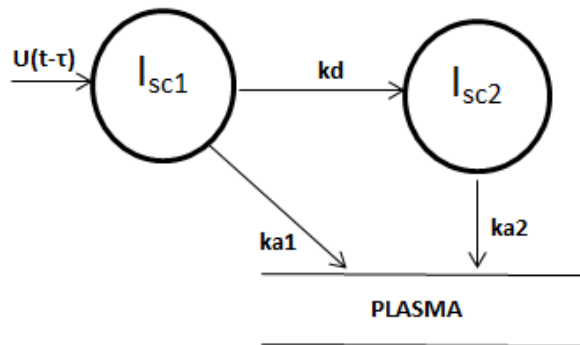


Figura 3.5: Modello con ritardo fisico.

Le equazioni che lo descrivono risultano essere:

$$\begin{aligned} \dot{I}_{sc1}(t) &= -(k_d + k_{a1})I_{sc1}(t) + U(t - \tau) & I_{sc1}(0) &= I_{sc1ss} \\ \dot{I}_{sc2}(t) &= k_d I_{sc1}(t) - k_{a2} I_{sc2}(t) & I_{sc2}(0) &= I_{sc2ss} \end{aligned} \quad (3.8)$$

con I_{sc1} e I_{sc2} rispettivamente quantità di insulina non monomerica e monomerica nel sottocute, $U(t)$ (U/min) dose esogena di insulina iniettata, $k_d(\text{min}^{-1})$ coefficiente di diffusione nel sottocute, $k_{a1}(\text{min}^{-1})$ costante di velocità di assorbimento nel plasma del primo compartimento e $k_{a2}(\text{min}^{-1})$ costante di velocità di assorbimento sottocutaneo di insulina del secondo compartimento, τ è invece il ritardo dell'assorbimento insulinico diverso per ogni soggetto e calcolato minimizzando la funzione obiettivo. Il flusso R_i di comparsa dell'insulina nel plasma è

quindi data da:

$$R_i(t) = k_{a1}I_{sc1}(t) + k_{a2}I_{sc2}(t) \quad (3.9)$$

3.2.2 Modello con ritardo compartimentale

Partendo sempre dal modello *Dalla Man et al.* si è deciso poi di inserire un ritardo non più in modo iterativo ma un ritardo generato mediante una serie di compartimenti. Analizzando il lavoro compiuto da *Savic et al.*[12] in cui viene effettuato un confronto tra le performance di un modello con un semplice ritardo e uno con un ritardo compartimentale è stato deciso di testare questa procedura pensando che la serie di compartimenti fosse una buona rappresentazione fisiologica del processo di diffusione dell'insulina nel sottocute. Il modello sviluppato è riportato di seguito in figura 3.6.

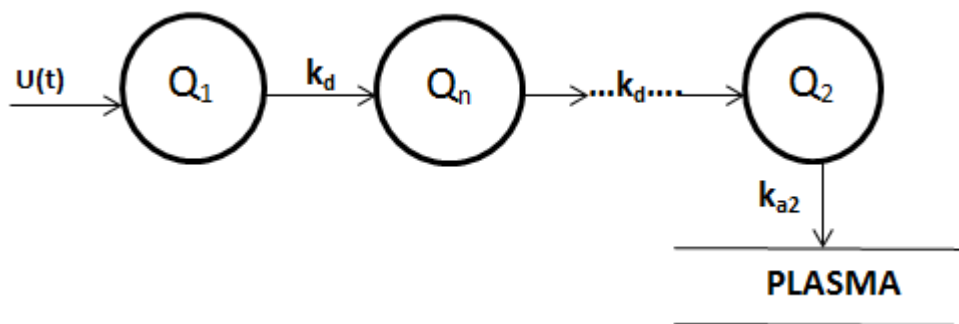


Figura 3.6: Modello con ritardo compartimentale.

Le equazioni che lo descrivono sono di conseguenza:

$$\begin{aligned}
 \dot{Q}_1(t) &= -k_d Q_1 + u(t) \\
 \dot{Q}_3(t) &= k_d Q_1 - k_d Q_3 \\
 \dot{Q}_4(t) &= k_d Q_3 - k_d Q_4 \\
 &\dots\dots\dots \\
 \dot{Q}_n(t) &= k_d Q_{n-1} - k_d Q_n \\
 \dot{Q}_2(t) &= k_d Q_n - k_{a2} Q_2
 \end{aligned} \quad (3.10)$$

In questo caso $U(t)$ (U/min) è la dose esogena di insulina iniettata, Q_1 è il sito di iniezione sottocutanea, mentre la catena Q_2, \dots, Q_n , è la catena di a_2 compartimenti che rappresentano i vari step di passaggio dell'insulina nel sottocute,

con $a_2=1, \dots, n$, diverso per ogni soggetto e calcolato, diversamente da *Savic et al.* in cui viene utilizzata una funzione che utilizza l'approssimazione di Stirling [12] per la sua stima, iterativamente selezionato minimizzando la funzione obiettivo. Come nel modello con ritardo fisico, $k_d(\text{min}^{-1})$ è il coefficiente di diffusione nel sottocute e $k_{a2}(\text{min}^{-1})$ costante di velocità di assorbimento sottocutaneo di insulina monomerica. Il flusso R_i di comparsa dell'insulina nel plasma è quindi data da:

$$R_i = k_{a2}Q_2 \tag{3.11}$$

Capitolo 4

Identificazione e selezione del modello

In questo capitolo vengono presentati gli elementi base della *teoria della stima* parametrica e i metodi di selezione del modello ottimo.

4.1 La stima parametrica

Utilizzando informazioni fisiologiche note e assumendo determinate ipotesi iniziali, è possibile descrivere il sistema oggetto di studio con un sistema di equazioni. Tale sistema di equazioni dunque costituisce un modello nel quale dobbiamo identificare il valore dei parametri p_1, p_2, \dots, p_N presenti in esso utilizzando le informazioni relative ai dati misurati. La funzione che relaziona il modello alle misure è data da $g(t, p)$ con

$$y(t) = g(t, p) \quad (4.1)$$

Solitamente nella realtà siamo in possesso di un segnale $y(t)$ composto da un numero N di campioni ai tempi t_1, t_2, \dots, t_N affetti da rumore. Le misure disponibili z_k risultano avere dunque la forma

$$z_k = y(t_k) + v_k = g(t_k, p) + v_k \quad k = 1, 2, \dots, N \quad (4.2)$$

dove v_k indica il rumore sulla misura $z_{k-esima}$ ed è assunto essere una variabile aleatoria a media nulla di cui abbiamo generalmente delle informazioni statistiche. La matrice di covarianza relativa a tale vettore è infatti data da:

$$\Sigma_v = E[vv^T] = \sigma^2 B \quad (4.3)$$

con σ^2 scalare, noto o incognito, e B matrice NxN che risulta diagonale nel caso di campioni scorrelati. A questo punto possiamo scrivere la (4.2) in forma vettoriale:

$$z = y + v = G(p) + v \quad (4.4)$$

dove $G(p) = [g(t_1, p)g(t_2, p)\dots g(t_N, p)]^T$.

In un contesto di stima Bayesiana, la grandezza che si desidera stimare non è più deterministica come nell'approccio Fisheriano dove si sfruttano solo i dati dell'esperimento, ma è una variabile aleatoria sui parametri ottenuta, oltre che dalla conoscenza del vettore dei dati, chiamata *informazione a posteriori* perchè legata all'esperimento, anche dall'*informazione a priori* sui parametri, indipendente dall'esperimento. In genere l'informazione sul vettore dei parametri p disponibile a priori è legata a informazioni di tipo statistico attuate da precedenti studi di popolazione. Questa tecnica definisce quindi:

$$f_p(p) = f_{p_1, p_2, \dots, p_M}(p_1, p_2, \dots, p_M) \quad (4.5)$$

$$f_{p|z}(p|z) = f_{p_1, p_2, \dots, p_M|z_1, z_2, \dots, z_M}(p_1, p_2, \dots, p_M|z_1, z_2, \dots, z_M) \quad (4.6)$$

dove $f_p(p)$ è la densità di probabilità a priori del vettore aleatorio p e $f_{p|z}(p|z)$ è la densità di probabilità a posteriori del vettore p dei parametri, con z vettore aleatorio delle misure.

In base alla *regola di Bayes*, la densità di probabilità a posteriori di p è data da:

$$\begin{aligned} f_{p|z}(p|z) &= \frac{f_{z|p}(z|p)f_p(p)}{f_z(z)} \\ &= \frac{f_{z_1, z_2, \dots, z_M|p_1, p_2, \dots, p_M}(z_1, z_2, \dots, z_M|p_1, p_2, \dots, p_M)f_{p_1, p_2, \dots, p_M}(p_1, p_2, \dots, p_M)}{f_{z_1, z_2, \dots, z_M}(z_1, z_2, \dots, z_M)} \end{aligned} \quad (4.7)$$

dove $f_p(p)$ è la densità di probabilità a priori di p e $f_{z_1, z_2, \dots, z_M}(z_1, z_2, \dots, z_M)$ è la densità di probabilità del vettore delle misure z e $f_{z|p}(z|p)$ è la *likelihood*, cioè la verosimiglianza di z che dipende dal modello $g(t, p)$ e dalla densità di probabilità dell'errore di misura $f_v(v)$ e che esprime la probabilità che si verifichino le misure z una volta fissato p.

Dalla $f_{p|z}(p|z)$ si possono definire vari stimatori puntuali. Tra i più usati in ambito Bayesiano si distingue il *Maximum a Posteriori* (MAP), definito come lo stimatore per cui noto il vettore dei dati z, la densità di probabilità a posteriori dei parametri è massima:

$$\hat{p}_{MAP} = \underset{p}{argmax} f_{p|z}(p|z) \quad (4.8)$$

La precedente espressione è semplificabile, infatti essendo

$$f_{p|z}(p|z) = \frac{f_{z|p}(z|p)f_p(p)}{f_z(z)} \quad (4.9)$$

dal momento che il denominatore non dipende da p , la stima MAP si può determinare anche come

$$\hat{p}_{MAP} = \underset{p}{\operatorname{argmax}} f_{z|p}(z|p)f_p(p) \quad (4.10)$$

Valutando il particolare caso in cui i vettori p e v sono gaussiani, si considera v come rumore bianco gaussiano a media nulla e con matrice di covarianza $\Sigma_v = \sigma^2 B$, dunque il vettore aleatorio z dato p , è gaussiano con media $G(p)$ e matrice di covarianza $\Sigma_v = \sigma^2 B$, mentre il vettore dei parametri p si considera estratto da una distribuzione gaussiana a media μ_p e varianza Σ_p , per cui si ha:

$$f_p(p) = \frac{1}{|(2\pi)^M \det(\Sigma_p)|^{\frac{1}{2}}} \exp\left(-\frac{1}{2}[p - \mu_p]^T \Sigma_p^{-1} [p - \mu_p]\right) \quad (4.11)$$

$$f_{z|p}(z|p) = \frac{1}{|(2\pi)^N \det(\Sigma_v)|^{\frac{1}{2}}} \exp\left(-\frac{1}{2}[z - G(p)]^T \Sigma_v^{-1} [z - G(p)]\right) \quad (4.12)$$

Da qui, la funzione di p da massimizzare è ottenuta, secondo la (4.10) come prodotto delle (4.11) e (4.12), passando al logaritmo e cambiando il segno, si ha che il problema diventa un problema di minimizzazione di questo tipo:

$$\hat{p}_{MAP} = \underset{p}{\operatorname{argmin}} [z - G(p)]^T \Sigma_v^{-1} [z - G(p)] + [p - \mu_p]^T \Sigma_p^{-1} [p - \mu_p] \quad (4.13)$$

in cui è evidente come lo stimatore bayesiano realizzi un compromesso fra informazione a posteriori legata all'aderenza del modello ai dati, nel primo addendo, e l'aderenza del vettore p all'informazione a priori, nel secondo addendo. A tal proposito si può notare come la matrice di covarianza Σ_p giochi un ruolo fondamentale: all'aumentare di essa, infatti, l'informazione a priori si fa via via sempre meno rilevante fino a diventare insignificante e far in modo che lo stimatore si affidi totalmente e unicamente alla sola informazione a posteriori come nel caso dello stimatore ai minimi quadrati.

Ad ogni modo anche nell'ipotesi appena sviluppata di gaussianità la funzione costo non è quadratica, perchè nel caso in esame il modello $G(p)$ non è lineare nei parametri e dunque per essere risolta necessita di algoritmi di tipo iterativo per la stima parametrica.

La precisione delle stime si può comunque valutare analizzando la matrice di covarianza della stima:

$$\text{cov}(\hat{p}) = \Sigma_p = E[\hat{p}\hat{p}^T] \quad (4.14)$$

Nel caso di misure indipendenti ed errore gaussiano lo stimatore Bayesiano ha la seguente proprietà:

$$\text{cov}(\hat{p}) = [F(p)|_{p=\hat{p}}]^{-1} \quad (4.15)$$

dove $F(p)$ è la matrice di informazione di Fisher, che per la stima Bayesiana nel caso di rumore bianco gaussiano a campioni scorrelati si dimostra essere pari a:

$$[F(p)]|_{p=\hat{p}} = S^T \Sigma_p^{-1} S + \Sigma_p^{-1} \quad (4.16)$$

con S matrice di elementi

$$S_{i,j} = \left. \frac{\partial g(t_i, p)}{\partial p_j} \right|_{p=\hat{p}} \quad (4.17)$$

4.1.1 Informazione a priori

L'informazione a priori per la stima Bayesiana è assunta di tipo gaussiano e costituita dal vettore delle medie μ_p e dalla matrice di covarianza Σ_p di elementi:

$$\mu_{p,i} = \frac{1}{H} \sum_{h=1}^H p_i^h \quad i = 1, 2, \dots, M \quad (4.18)$$

$$\sigma_{i,j}^2 = \frac{1}{H} \sum_{h=1}^H (p_i^h - \mu_{p,j})^2 \quad i = 1, 2, \dots, M \quad (4.19)$$

dove $\mu_{p,i}$ è l' i -esima componente del vettore μ_p , p_i^h è l' i -esima componente del vettore p relativo all' h -esimo soggetto, H è il numero totale di soggetti e M è il numero totale di parametri.

A seconda dei modelli identificati sono stati utilizzati diversi prior. Per tutti i modelli identificati in letteratura e in quelli nuovi sviluppati, è stato impiegato un prior con CV=20% sul volume di distribuzione del plasma per favorire l'identificabilità dei modelli. Inoltre, per il modello Wilinska *et al.*, è stato aggiunto un prior con CV=40% nei parametri della cinetica Michaelis-Menten, V_{max} e K_m , in quanto non era dimostrabile l'identificabilità a priori del modello. Come riportato in letteratura, il modello era stato infatti originariamente identificato con una tecnica ITS.

4.1.2 Informazione a posteriori

Considerando la struttura generale della matrice di covarianza dell'errore delle misure Σ_v dove i campioni sono tra loro incorrelati:

$$\Sigma_v = \begin{bmatrix} (sd_1)^2 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & (sd_2)^2 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & (sd_n)^2 \end{bmatrix}$$

In generale come già accennato precedentemente, Σ_v può essere scritta come:

$$\Sigma_v = \sigma^2 B \quad (4.20)$$

dove σ^2 è uno scalare e B è una matrice nota.

Per quanto riguarda i dati di concentrazione di insulina plasmatica è stato assunto che l'errore nelle misure fosse rumore bianco gaussiano a media nulla e standard deviation SD non nota. A partire da ciò si ha che:

$$\begin{aligned} \Sigma_v &= \begin{bmatrix} (sd_1)^2 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & (sd_2)^2 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & (sd_n)^2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} (sd)^2 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & (sd)^2 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & (sd)^2 \end{bmatrix} = \\ &= sd^2 \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 1 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & 1 \end{bmatrix} = \sigma^2 B \end{aligned}$$

da cui si ricava:

$$\sigma^2 = sd^2 \quad (4.21)$$

Nel nostro caso è stata considerata SD non nota a priori dunque B è una matrice identità e σ^2 è stato stimato a posteriori.

Inoltre tutti i valori al di sotto della soglia di sensibilità (BQL) sono stati posti a varianza infinita e quindi non tenuti in considerazione nel processo di stima.

4.1.3 Minimizzazione della funzione obiettivo

Essendo in un contesto di stima bayesiana con rumore di misura non noto, il problema di minimizzazione della funzione obiettivo non è banale. Per questo è stata considerato uno stimatore MAP con pesi relativi sui dati. Il problema di

identificazione risulta esprimibile come:

$$R(p) = \sum_{i=1}^{N_i} \left(\frac{(y_i - s(\hat{p}_i, t_i))^2}{\sigma^2} + \log[V_i(s(\hat{p}, t_i), y_i, \sigma^2)] \right) + \sum_{k=1}^{N_b} \frac{(p_k - \mu_{p,k})^2}{\sigma_{p,k}} + \log(\sigma_p^2) \quad (4.22)$$

con

$$V_i(s(\hat{p}, t_i), y_i, \sigma^2) = \sigma^2 B \quad (4.23)$$

e

$$\sigma^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N_i} \frac{(y_i - s(\hat{p}_i, t_i))^2}{V_i(s(\hat{p}, t_i), y_i, 1)} \quad (4.24)$$

In particolare si ha che, nell'equazione 4.22 il primo termine indica l'aderenza del modello ai dati, il secondo rappresenta il termine di varianza stimata a posteriori, il terzo indica l'aderenza al prior e il quarto indica il termine di varianza del prior. In particolare si ha che $R(p)$ è la funzione obiettivo, y_i è l' i -esimo dato, $s(\hat{p}, t_i)$ è il valore del modello corrispondente al campione y_i relativo al tempo t_i , N_i è il numero dei dati, N_b è il numero dei parametri Bayesiani, mentre $V_i(s(\hat{p}, t_i), y_i, \sigma^2)$ è la varianza stimata a posteriori per i dati y_i ai tempi t_i [16].

Il modello considerato risulta essere non lineare nei parametri, dunque per ottenere la soluzione del problema si fa ricorso a tecniche numeriche iterative.

4.1.4 Precisione delle stime

Per il calcolo della precisione delle stime, per prima cosa, la matrice di covarianza delle stime:

$$\Sigma_{\hat{p}} = (J^T J + \Sigma_p^{-1})^{-1} \quad (4.25)$$

dove J rappresenta lo Jacobiano.

Da qui è stata calcolata la deviazione standard $SD_{\hat{p},i}$ di ciascuno dei parametri stimati \hat{p} , ricavata dalla radice quadrata delle varianze che compongono la diagonale di $\Sigma_{\hat{p}}$:

$$SD_{\hat{p},i} = \sqrt{\sigma_{\hat{p},ii}^2} \quad i = 1, 2, \dots, M \quad (4.26)$$

con $\sigma_{\hat{p},ii}$ elementi della diagonale della matrice $\Sigma_{\hat{p}}$.

Conseguentemente a ciò è stato dunque ricavato, come indicatore delle precisioni dei parametri, il coefficiente di variazione $CV_{\hat{p},i}$ per i parametri stimati \hat{p} come:

$$CV_{\hat{p},i} = \frac{SD_{\hat{p},i}}{\hat{p}_i} \quad i = 1, 2, \dots, M \quad (4.27)$$

Per quanto riguarda i nuovi modelli sviluppati, è stato possibile identificare alcuni casi critici in cui non tutti i parametri erano stimati con precisione

($CV > 100\%$). La procedura di identificazione prevedeva dunque di identificare il modello completo per ogni soggetto e, nel caso in cui si verificasse una delle seguenti condizioni, il modello veniva opportunamente semplificato e reidentificato:

- $K_d = k_{a2}$;
- $k_{a1} = 0$;
- $k_{a1} = 0, k_d = k_{a2}$;
- $k_{a2} = k_d + k_{a1}$.

4.2 Selezione del modello

Ogni modello descritto nel capitolo 3 è stato identificato sulla base dei data set presentati al capitolo 2. Per la selezione del modello ottimo, i modelli sono stati confrontati sulla base di criteri standard [16]:

- Identificabilità: è stata valutata l'identificabilità a priori dei modelli, e, sfruttando la precisione delle stime, anche quella a posteriori;
- Precisione delle stime: si assume che un parametro sia stimato con precisione quando il CV è minore del 100%, dove:

$$CV_{\hat{p},i} = \frac{SD_{\hat{p},i}}{\hat{p}_i} \quad i = 1, 2, \dots, M$$

con $SD_{\hat{p},i}$ standard deviation e \hat{p}_i stima dell' i -esimo parametro;

- Bontà del fit: il fit del modello deve riuscire a descrivere correttamente l'andamento dei dati. Viene dunque valutato il WRSS che va a minimizzare la distanza del modello dai dati;
- Bianchezza dei residui pesati (*runtest*): i residui pesati devono essere compresi tra $+/-1$ e devono essere sufficientemente bianchi.

Capitolo 5

Risultati

Di seguito verranno evidenziati, passo a passo, i risultati ottenuti per i vari modelli, analizzando le varie caratteristiche per ciascuno di essi e selezionando infine il modello ottimo prescelto.

5.1 Modelli in letteratura

5.1.1 Identificabilità

I modelli principali tratti dalla letteratura e analizzati in questa Tesi sono, come precedentemente detto, il modello *Dalla Man et al.*, il modello *Wilinska et al.* e il modello *Lv et al.* Su tutti i modelli è stata dapprima effettuata un'analisi di identificabilità a priori e, successivamente, i modelli di assorbimento sottocutaneo accoppiati ad una cinetica lineare monocompartimentale del plasma, sono stati identificati ottenendo i seguenti risultati:

- **Modello *Dalla Man et al.*:** presenta 5 parametri da stimare (V , k_e , k_d , k_{a1} , k_{a2}) ed è a priori localmente identificabile, ammettendo 6 possibili soluzioni. È stato dunque aggiunto un Bayesiano al 20% su 'V' sfruttando informazioni di popolazione[13], per favorire l'identificabilità. Il modello a questo punto risulta essere ancora localmente identificabile con 2 soluzioni per k_d e k_{a2} , che risultano essere intercambiabili.
- **Modello *Wilinska et al.*:** presenta 7 parametri da stimare (V , k_e , k_{a1} , k_{a2} , k , V_{max} , K_m) e, la sua versione linearizzata, ottenuta linearizzando la cinetica di degradazione di Michaelis-Menten, risulta essere localmente identificabile; mentre nella sua versione originale non lineare non si può dire nulla (si ricorda che nell'articolo [11] viene utilizzato il metodo iterativo ITS per l'identificabilità). È stato quindi posto un Bayesiano al 20% sui parametri

‘V’ per favorire l’identificabilità e uno al 40% su ‘ V_{max} ’ e ‘ K_m ’ per assicurare l’identificabilità a priori.

- **Modello *Lv et al.*:** presenta 7 parametri da stimare ($V, k_e, k_d, b_1, b_2, k_a, a_2$) ed è a priori non identificabile. Nel processo di identificazione, il parametro a_2 è stato iterativamente selezionato come ottimo quello che minimizza la funzione obiettivo. In[9] il volume del plasma è stato derivato a posteriori dalla dose e dalla perdita irreversibile ‘ k_e ’, quest’ultimo stimato con bayesiano. Nel nostro caso, per assicurare l’identificabilità è stato posto ancora una volta un Bayesiano al 20% su V come per i modelli precedenti.

Dunque in definitiva, è stato utilizzato per tutti i modelli un bayesiano al 20% sul volume del plasma, noto da informazioni a priori sfruttando i risultati di Campioni *et al.*[13].

5.1.2 Stima parametrica

Ogni modello è stato testato sui tre dataset disponibili. Di seguito si riportano i valori della media +/-SD dei parametri stimati con i relativi CV (media +/-SD) (figure 5.1, 5.2, 5.3). Tutti i risultati sono ottenuti scartando i soggetti 103 e 127 del Data Base 2, e il soggetto 110 del Data Base 3, perchè considerati outliers.

	Vi (L/kg)	Ke (min⁻¹)	Kd (min⁻¹)	Ka1 (min⁻¹)	Ka2 (min⁻¹)
Data Base 1	0,13 +/-0,024 (16+/-2,08)	0,11 +/-0,025 (17+/-2,2)	0,025 +/-0,015 (358759,6+/-672269,1)	0,00018 +/-0,00065 (5,1E+11+/-1,08E+12)	0,014 +/-0,005 (288784,2+/-544822,2)
Data Base 2	0,13 +/-0,016 (16+/-1,48)	0,097 +/-0,023 (17+/-2,05)	0,018 +/-0,006 (656683,9+/-669878,7)	8,63E-09 +/-2,22E-08 (2,41E+11+/-9,76E+11)	0,017 +/-0,0046 (481808,7+/-488995,3)
Data Base 3	0,12 +/-0,0129 (16+/-1,37)	0,14 +/-0,024 (17+/-1,89)	0,023 +/-0,00899 (893499,7+/-1100920)	0,000116 +/-0,004885 (1,7E+11 +/-6,11E+11)	0,019 +/-0,0065 (649325,2+/-813755,9)

Tabella 5.1: Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD): Modello *Dalla Man et al.*.

Analizzando i parametri stimati si nota che essi hanno un’alta variabilità e vengono ricavati con scarsa precisione. Il modello *Lv et al.* identifica con precisione (ossia tutti i parametri con CV<100%) un numero maggiore di soggetti rispetto agli altri modelli. Per numero di soggetti identificati si intendono quei soggetti per cui il CV di ogni parametro stimato è minore del 100%. Ciò è probabilmente

CAPITOLO 5. RISULTATI

	Vi (L/kg)	Ke (min⁻¹)	Ka1 (min⁻¹)	Ka2 (min⁻¹)	K (%)	Vmax (mU/min)	kM (mU)
Data Base 1	0,11 +/-0,023 (20+/-3,01)	0,105 +/-0,029 (28+/-9,38)	0,018 +/-0,005 (8+/-4)	0,0012 +/-0,0018 (80826+/-400833)	0,724 +/-0,144 (39+/-14)	1,817 +/-0,282 (43+/-8,2)	63,40 +/-1,454 (40+/-0,86)
Data Base 2	0,11 +/-0,01 (20+/-1,43)	0,083 +/-0,023 (34+/-9,42)	0,018 +/-0,005 (10+/-5,02)	0,00025 +/-0,00035 (135614+/-538811)	0,772 +/-0,144 (48+/-10,79)	1,92 +/-0,136 (40+/-3,02)	63,09 +/-1,481 (40+/-0,93)
Data Base 3	0,11 +/-0,012 (21+/-1,71)	0,131 +/-0,02 (26+/-4,57)	0,0211 +/-0,0061 (8+/-3,47)	0,00078 +/-0,0013 (148614+/-418972)	0,802 +/-0,075413 (45+/-16,47)	1,912 +/-0,179507 (41+/-5,02)	63,2052 +/-1,1099 (40+/-0,68)

Tabella 5.2: Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD): Modello *Wilinska et al.*.

	a2	Vi (L/kg)	Ke (min⁻¹)	Kd (min⁻¹)	b1 (min⁻¹)	b2 (min⁻¹)	Ka (min⁻¹)
Data Base 1	11,6 +/-13,03	0,10 +/-0,010 (16+/-1,47)	0,143 +/-0,03 (16+/-1,52)	0,144 +/-0,271 (16+/-85,4)	0,040 +/-0,033 (86+/-241,48)	0,332 +/-0,326 (918+/-4537,24)	0,016 +/-0,031 (1498+/-5661,6)
Data Base 2	17,2 +/-18,4	0,097 +/-0,018 (17+/-2,52)	0,136 +/-0,024 (17+/-2,62)	0,0211 +/-0,343 (144+/-351)	0,061 +/-0,0159 (86+/-282,9)	0,396 +/-0,318 (14648+/-61673,8)	0,067 +/-0,157 (81936+/-243537)
Data Base 3	15,5 +/-18,4	0,11 +/-0,013 (16+/-1,86)	0,167 +/-0,020 (16+/-1,81)	0,0271 +/-0,37 (368+/-1245,23)	0,052 +/-0,047 (3,7E+12+/-2,4E+13)	0,382 +/-0,353 (3031+/-12016,6)	0,035 +/-0,0094 (29223+/-137702)

Tabella 5.3: Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD): Modello *Lv et al.*.

dovuto al maggior numero di gradi di libertà del modello e alla capacità di introdurre un ritardo nell'assorbimento tipicamente osservato in tutti i dataset a nostra disposizione grazie alla presenza di due catene compartimentali.

Un punto di debolezza del modello *Lv et al.* infatti è dato dal fatto che è presente un'alta variabilità nei parametri: dalla tabella 5.3 si vede infatti come per alcuni parametri l'indice di dispersione (SD) risulti maggiore rispetto al valor centrale (media), indice di un'alta variabilità nella popolazione e/o un'incapacità del modello a ricavare una precisa distribuzione di quel parametro nella popolazione. Tuttavia, l'elevato numero di compartimenti è difficilmente interpretabile dal punto di vista fisiologico.

5.1.3 Analisi dei fit e dei residui pesati

Nelle figure 5.1, 5.2, 5.3 che seguono, sono rappresentati l'andamento dei fit e dei residui pesati per i tre modelli testati sui tre dataset. Dati e predizioni sono riportati in mU/L, mentre i residui pesati sono adimensionali.

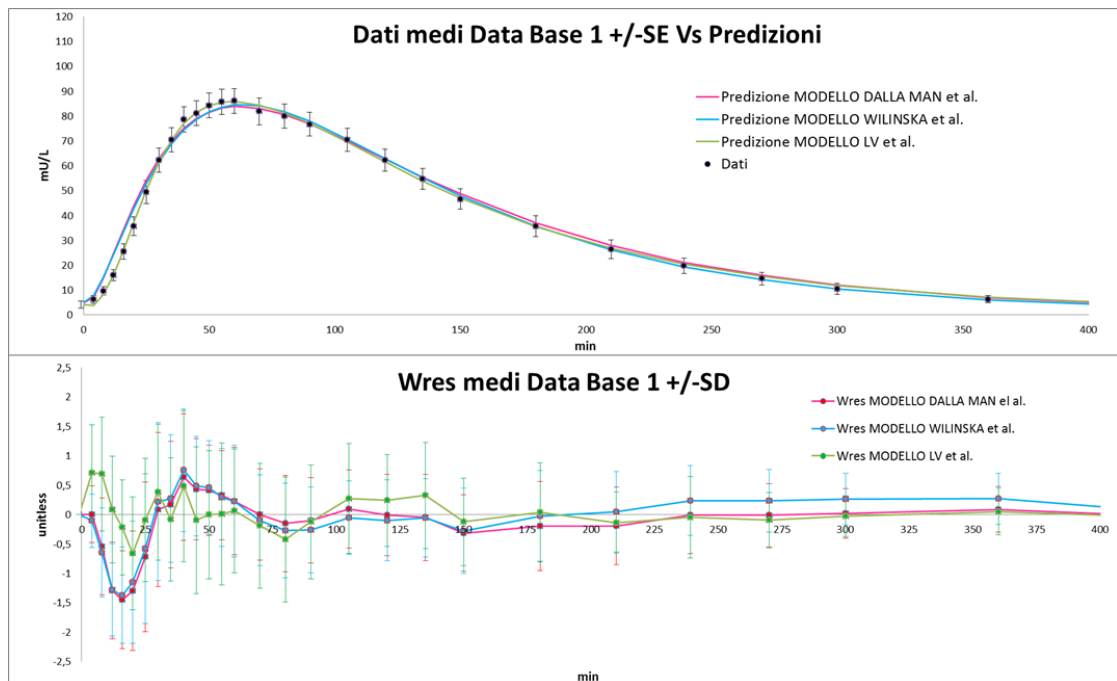


Figura 5.1: Modelli della letteratura a confronto: fit e residui pesati Data Base 1.

Dalla predizione dei modelli rispetto ai dati e dai residui pesati è evidente come in generale i modelli *Dalla Man et al.* (fit in rosso) e *Wilinska et al.* (fit in blu) non riescono a predire bene i dati. Essi infatti non hanno un buon fit nella parte di comparsa dell'insulina nel plasma, che non sembra rispettare il ritardo nella comparsa e tendono inoltre a sottostimare il picco faticando infine a seguire i dati nella parte di scomparsa. Il modello di *Lv et al.* sembra invece descrivere abbastanza bene i dati, sicuramente grazie all'elevato numero di gradi di libertà. A conferma dell'andamento dei fit, si nota come i residui pesati, per i modelli *Dalla Man et al.* e *Wilinska et al.* risultino essere poco scorrelati, al contrario, il modello *Lv et al.* presenta buoni residui, compresi nel range unitario e abbastanza scorrelati.

CAPITOLO 5. RISULTATI

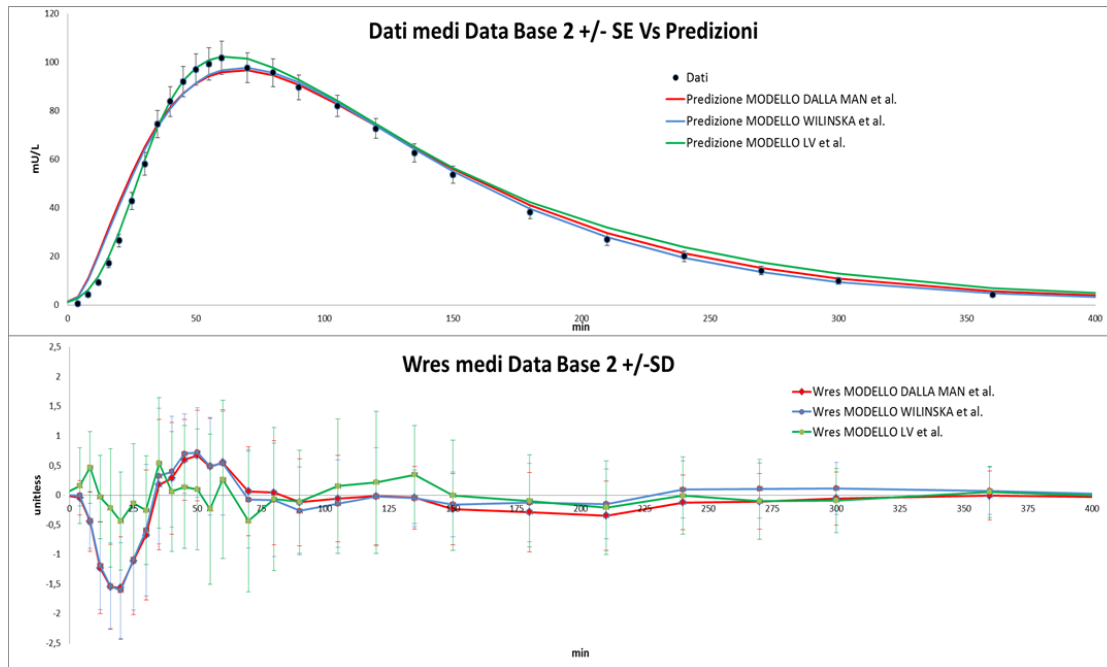


Figura 5.2: Modelli della letteratura a confronto: fit e residui pesati Data Base 2.

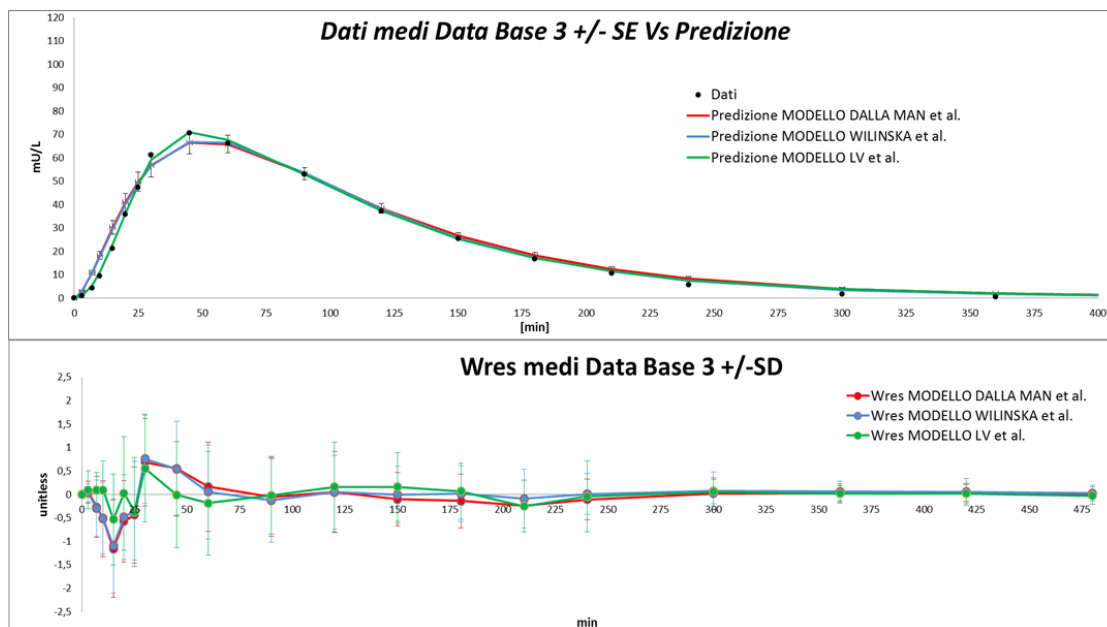


Figura 5.3: Modelli della letteratura a confronto: fit e residui pesati Data Base 3.

5.1.4 Discussione

Dal confronto dei primi modelli analizzati si nota come a prima vista, il modello di *Lv et al.* risulti migliore rispetto agli altri, sia per quanto riguarda il numero di soggetti identificati con precisione nei vari dataset, che per analisi dei fit e dei residui. Tuttavia, è necessario sottolineare alcuni punti chiave. Il modello presenta un elevato numero di compartimenti, senza un corrispettivo significato fisiologico; inoltre nel modello è stato fissato dagli autori un parametro *ad hoc* (parametro della cinetica che entra nella catena fissa a due compartimenti fissato a 0.04 min^{-1} , vedi figura 3.4)[13] senza un corrispettivo prior dalla letteratura, per evitare problemi di non identificabilità del modello. A causa di questo fatto, ossia che non tutti i parametri sono identificabili a partire dai dati, ma alcuni fissati *ad hoc*, si nega la possibilità di testare il modello con criteri di validazione come il criterio di Akaike(AIC) che non sarebbe applicabile per definizione. Infine, nel modello *Lv et al.*, per alcuni parametri l'indice di dispersione (SD) risulta maggiore rispetto al valor centrale (media), indicativo di una stima poco precisa delle distribuzioni dei parametri.

Per quanto riguarda il modello *Wilinska et al.*, pur avendo una limitata variabilità dei parametri, esso tende a sovrastimare la fase di comparsa e sottostimare il picco. Il modello in questione, come già accennato nel capitolo introduttivo, era stato originariamente identificato in un dataset con campionamento più sparso (30 min), mentre nel dataset impiegato in questo lavoro, con campionamento molto più fitto, specialmente nella fase post-iniezione, ha permesso di mostrare che tale modello non è capace di descrivere perfettamente i dati, specialmente nei primi 30 minuti.

In questo lavoro di Tesi si è dunque ritenuto opportuno progettare dei nuovi modelli per l'assorbimento sottocutaneo di insulina, a partire dal modello *Dalla Man et al.* grazie alla sua semplicità e significato fisiologico. Tale modello infatti evidenzia un problema soprattutto nella fase di salita in cui sembra non rispettare il reale andamento dei dati di insulina, che rispetto ad esso hanno un leggero ritardo. Si è dunque pensato di partire proprio da questo modello e di andare ad aggiungere, con varie metodologie, una forma di ritardo, per ottenere una buona descrizione dell'andamento di insulina, non solo in quanto a fit e andamento dei residui ma anche sulla base della precisione nelle stime dei parametri.

5.2 Nuovi modelli sviluppati

Come anticipato sopra, i nuovi modelli sviluppati in questa Tesi prevedono l’inserimento di un ritardo nel modello *Dalla Man et al.* al fine di migliorarne le prestazioni e renderlo capace di descrivere i dati con precisione fornendo un significato fisiologico ai parametri.

5.2.1 Identificabilità

Su tutti i nuovi modelli sviluppati, la cui struttura è stata descritta nel capitolo 3, sono state fatte le seguenti valutazioni:

- **Modello con ritardo fisico:** è stata effettuata innanzitutto un’analisi dell’identificabilità a priori: presenta 6 parametri da stimare ($V, k_e, k_d, k_{a1}, k_{a2}, \tau$) con τ iterativamente selezionato, a priori è localmente identificabile e ammette 6 possibili soluzioni. È stato dunque aggiunto un Bayesiano al 20% su ‘V’ per favorire l’identificabilità, da qui è risultato che il modello era ancora localmente identificabile con 2 soluzioni per k_d e k_{a2} intercambiabili.
- **Modello con ritardo compartimentale:** presenta 5 parametri da stimare (V, k_e, k_d, k_{a2}, a_2), con a_2 iterativamente selezionato, a priori è localmente identificabile con 4 possibili soluzioni. Viene dunque posto un bayesiano su ‘V’ al 20% per favorirne l’identificabilità.

È importante notare che, nei due modelli sviluppati, i parametri τ e a_2 , rispettivamente del modello con ritardo fisico e compartimentale, non vengono “stimati” ma iterativamente selezionati a causa di problemi numerici. Infatti, tali parametri possono assumere solo valori interi, rendendo impossibile il processo standard di stima e di calcolo della precisione. Per questo motivo, questi parametri vengono iterativamente identificati e il valore ottimo viene selezionato andando a minimizzare la funzione di costo.

In relazione a questi modelli, come già accennato nel capitolo 2, è stato possibile identificare alcuni casi critici in cui non tutti i parametri erano stimati con precisione ($CV > 100\%$). La procedura di identificazione prevedeva dunque di identificare il modello completo per ogni soggetto e, nel caso in cui si verificasse una delle seguenti condizioni, il modello veniva opportunamente semplificato e reidentificato:

- $k_d = k_{a2}$;
- $k_{a1} = 0$;
- $k_{a1} = 0, k_d = k_{a2}$;
- $k_{a2} = k_d + k_{a1}$.

5.2.2 Stima parametrica

La stima dei parametri effettuata è riportata nelle tabelle 5.4, 5.5 e 5.6 sottostanti.

Data Base 1	t	a2	Vi (L/kg)	Ke (min ⁻¹)	Kd (min ⁻¹)	Ka1 (min ⁻¹)	Ka2 (min ⁻¹)	SD	RUNTEST	WRSS
MODELLO CON RITARDO FISICO	7,4 +/- 5,09		0,13 +/-0,019 (15+/-3,06)	0,11 +/-0,030 (15+/-3,41)	0,039 +/-0,027 (30+/-39,7)	0,00081 +/-0,0019 <u>Stimato in 9 soggetti</u> (20+/-24,25)	0,012 +/-0,006 (9+/-6,45)	3,63	78,3%	321,41
MODELLO CON RITARDO COMPARTIMENTALE		2,5 +/-1,7	0,11 +/-0,024 (19+/-4,5)	0,13 +/-0,04 (19+/-4,9)	0,12 +/-0,17 (24+/-2)	<u>Non presente</u>	0,011 +/-0,005 (7+/-6,66)	3,61	67,56%	316,66

Tabella 5.4: Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD) Data Base 1: Modelli sviluppati a confronto.

Data Base 2	t	a2	Vi (L/kg)	Ke (min ⁻¹)	Kd (min ⁻¹)	Ka1 (min ⁻¹)	Ka2 (min ⁻¹)	SD	RUNTEST	WRSS
MODELLO CON RITARDO FISICO	9,6 +/- 5,19		0,13 +/-0,013 (16+/-3,2)	0,10 +/-0,02 (16+/-3,6)	0,04 +/-0,02 (25+/-19,9)	0,00041 +/-0,0013 <u>Stimato in 5 soggetti</u> (33+/-23,07)	0,014 +/-0,008 (10+/-8,15)	4,24	86,11%	405,86
MODELLO CON RITARDO COMPARTIMENTALE		3,13 +/-2,14	0,12 +/-0,014 (18+/-3,15)	0,11 +/-0,03 (18+/-3,5)	0,11 +/-0,094 (24+/-18,6)	<u>Non presente</u>	0,012 +/-0,004 (9+/-10,27)	4,18	86,11%	393,29

Tabella 5.5: Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD) Data Base 2: Modelli sviluppati a confronto.

Data Base 3	t	a2	Vi (L/kg)	Ke (min ⁻¹)	Kd (min ⁻¹)	Ka1 (min ⁻¹)	Ka2 (min ⁻¹)	SD	RUNTEST	WRSS
MODELLO CON RITARDO FISICO	7,6 +/- 4,9		0,12 +/-0,008 (18+/-1,9)	0,15 +/-0,03 (18+/-2,2)	0,038 +/-0,02 (28+/-27,3)	0,0010 +/-0,0019 <u>Stimato in 16 soggetti</u> (37+/-22,9)	0,0196 +/-0,0190 (16+/-16,5)	2,25	100%	132,08
MODELLO CON RITARDO COMPARTIMENTALE		2,9 +/-3	0,12 +/-0,014 (19+/-2,56)	0,15 +/-0,03 (19+/-2,9)	0,12 +/-0,17 (29+/-16,9)	<u>Non presente</u>	0,014 +/-0,005 (10+/-6,22)	3,41	97,56%	145,77

Tabella 5.6: Parametri stimati (media +/-SD) e CV (media+/-SD) Data Base 3: Modelli sviluppati a confronto.

Dall'analisi dei parametri stimati si nota che per entrambi i modelli c'è una buona variabilità nei parametri, infatti l'indice SD è quasi sempre minore della

media, indice di precisione della variabilità dei parametri. Nel modello con ritardo fisico, k_{a1} viene stimato solo per pochi soggetti (9 soggetti nel data base 1 e 5 nel data base 2 e 16 nel data base 3), ciò significa che generalmente il passaggio diretto dell'insulina dal sito di iniezione al plasma è raro. Si osserva inoltre che nel modello con ritardo compartimentale, il numero di compartimenti aggiuntivi rispetto al modello *Dalla Man et al.* varia tra 3 e 4. Come ultima nota, nelle tabelle è presente SD (mU/L) che rappresenta la deviazione standard stimata a posteriori e WRSS ovvero la somma dei residui pesati non corretti per la stima a posteriori. Infine, viene indicata la probabilità, espressa in percentuale, del numero di volte in cui viene superato il *runtest* relativo alla correlazione tra i residui, che verrà discussa nella sezione successiva.

5.2.3 Analisi dei fit e dei residui pesati

Si riportano di seguito nelle figure 5.4, 5.5, 5.6, i fit delle predizioni dei modelli indicati nella legenda e i relativi residui pesati.

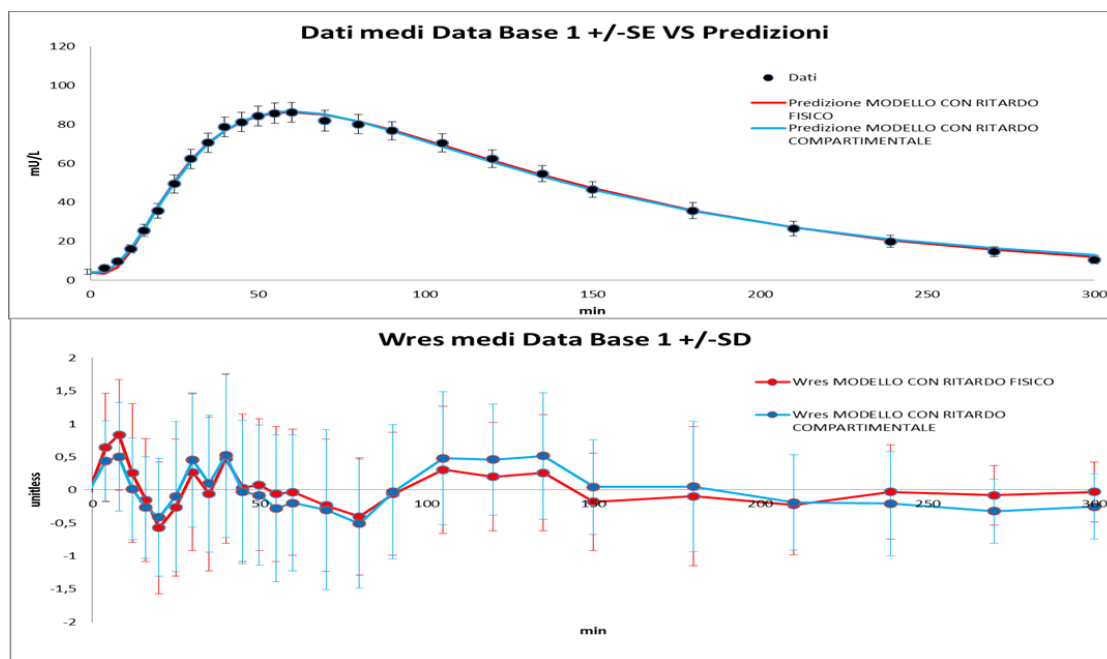


Figura 5.4: Nuovi modelli sviluppati a confronto, fit e residui pesati: Data Base1.

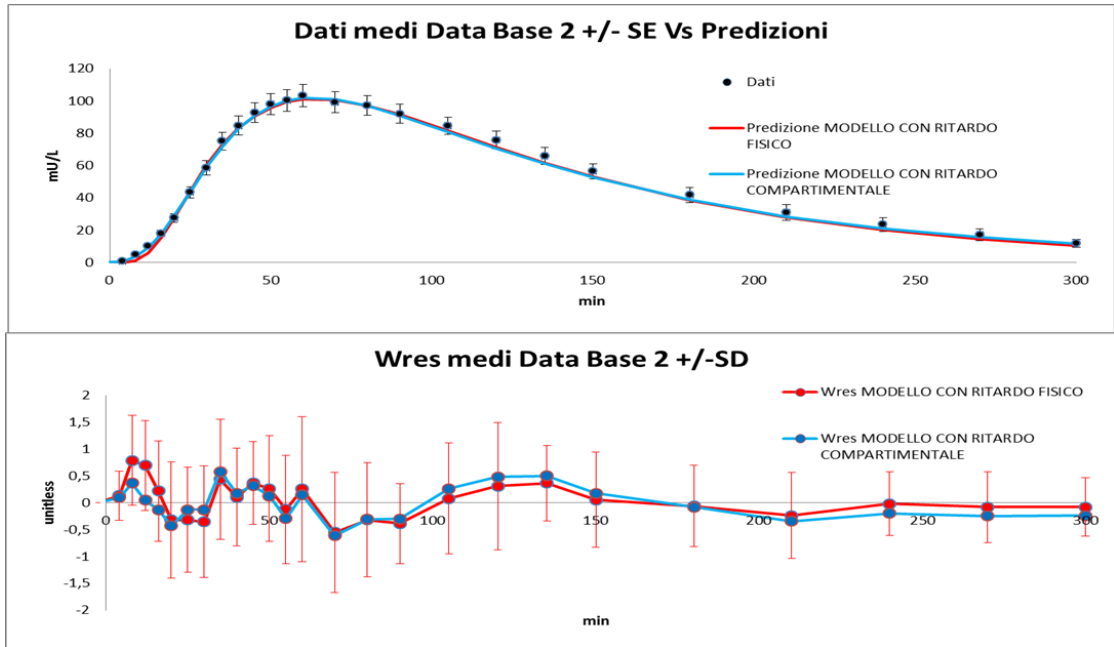


Figura 5.5: Nuovi modelli sviluppati a confronto, fit e residui pesati: Data Base2.

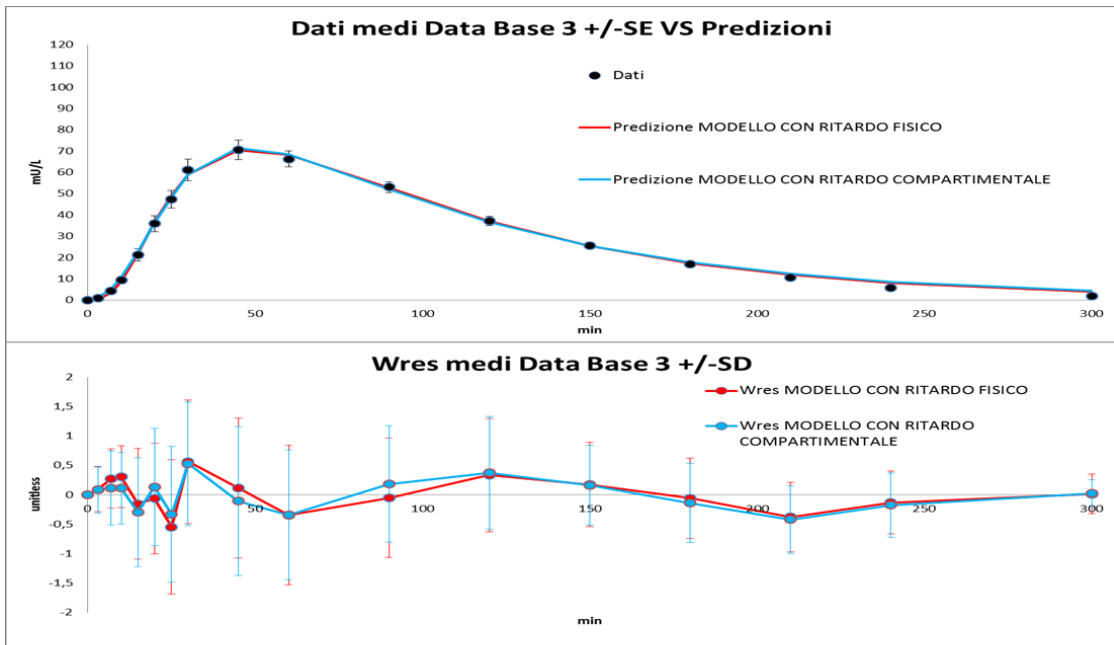


Figura 5.6: Nuovi modelli sviluppati a confronto, fit e residui pesati: Data Base3.

CAPITOLO 5. RISULTATI

Da un'analisi iniziale sembra che i due modelli sviluppati abbiano tutti un buon andamento sia per quanto riguarda il fit che per quanto riguarda i residui pesati, i quali risultano scorrelati e ad ampiezza unitaria per tutti e due i modelli. Al fine di valutare meglio i modelli si riporta in dettaglio la capacità dei modelli di predire la fase di comparsa e scomparsa dell'insulina (figure 5.7 e 5.8).

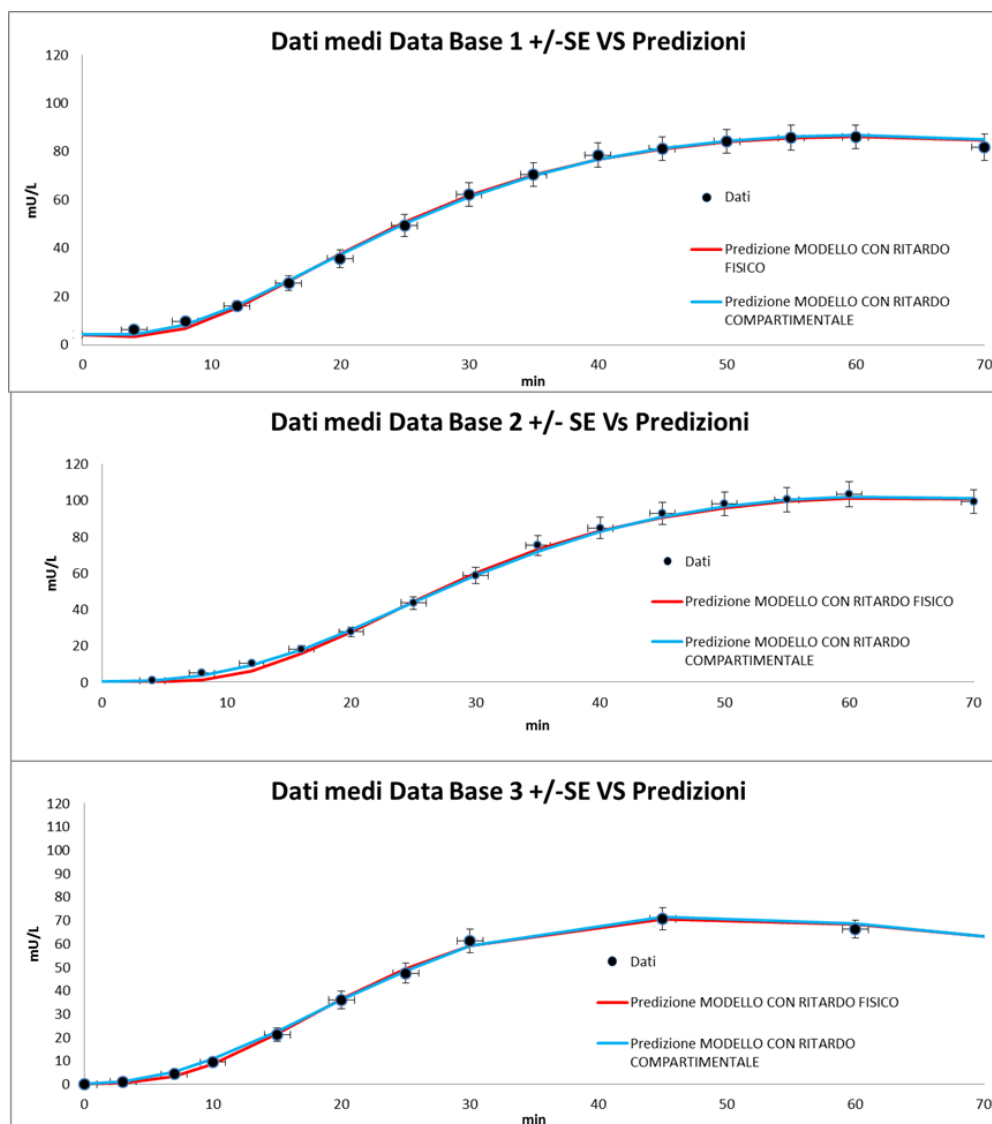


Figura 5.7: Fit medi +/-SE della fase di comparsa dell'insulina per i due nuovi modelli.

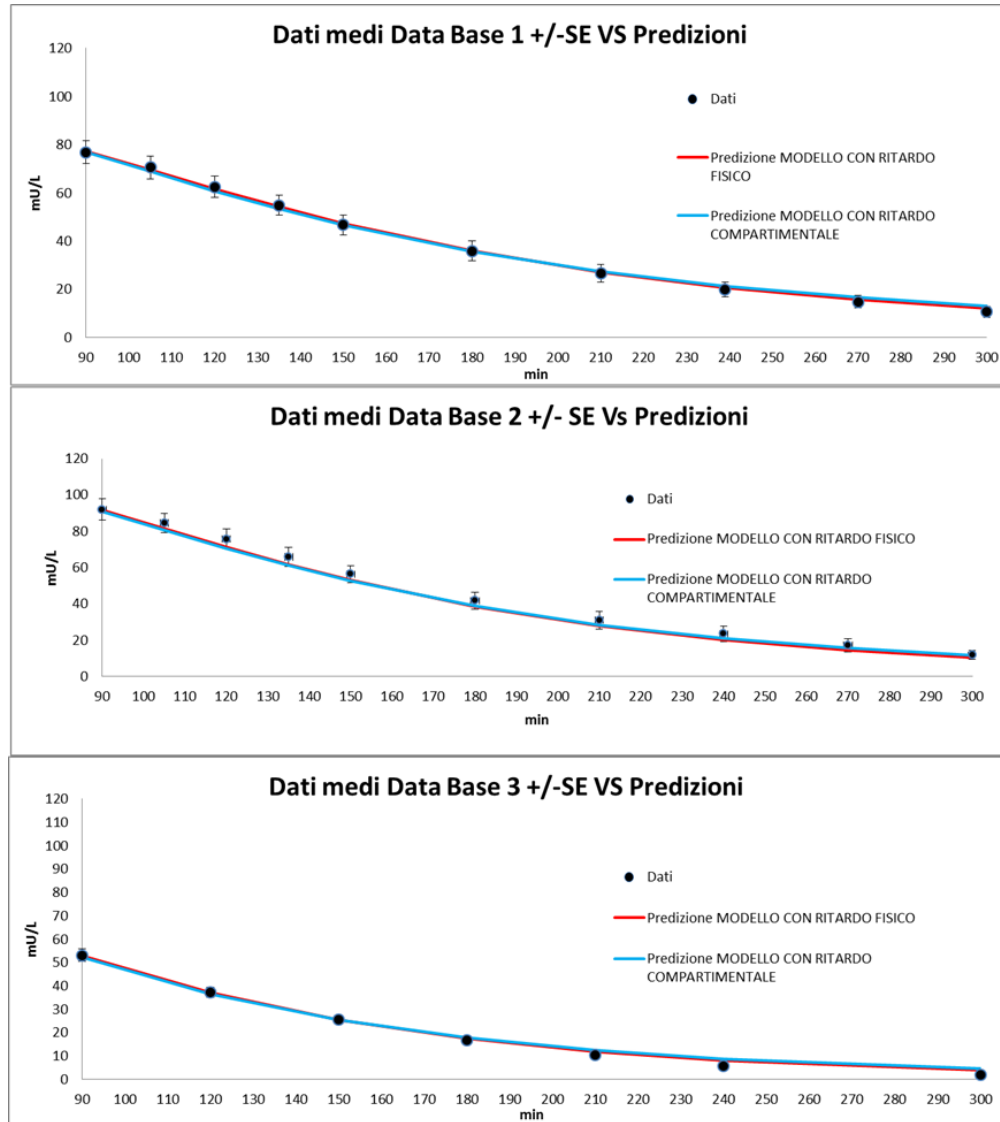


Figura 5.8: Fit medi +/-SE della fase di scomparsa dell'insulina per i due modelli.

Dall'analisi dei fit si possono trarre le seguenti considerazioni:

- Modello con ritardo fisico: sottostima leggermente la fase di comparsa dell'insulina, buona la fase di picco e di scomparsa dell'insulina;
- Modello con ritardo compartimentale: bene la fase di comparsa dell'insulina e picco, sottostima la fase di scomparsa dell'insulina;

L'analisi sui fit viene poi supportata dall'analisi dei residui pesati che forniscono un riscontro sulle valutazioni appena fatte. Infine, come accennato nel paragrafo

precedente, per quanto riguarda i residui pesati è stato effettuato un test di bianchezza (*runtest*) i cui risultati sono stati riportati nelle tabelle 5.4, 5.5 e 5.6. Da qui, si nota che il modello con ritardo fisico è quello che supera il test, in ogni data set, la maggior parte delle volte, rispetto al modello con ritardo compartimentale, almeno il 78.9% delle volte.

5.2.4 Discussione e selezione del modello

Dalle analisi effettuate sui nuovi modelli progettati, si evince dunque che, rispetto ai modelli della letteratura che non riuscivano a stimare in modo ottimale il ritardo della comparsa di insulina nel plasma, abbiamo un netto miglioramento in quanto a fit (rispetto soprattutto ai modelli *Dalla Man et al.* e *Wilinska et al.*). È sostanziale anche il miglioramento dei parametri stimati (rispetto a tutti i modelli di letteratura). Si nota infatti che questi modelli riescono ad indentificare in toto i soggetti disponibili, mantenendo dunque i CV di ogni parametro sotto il 100%. Abbiamo visto inoltre, come ciascun modello abbia una buona distribuzione dei parametri, diversamente dal precedente modello di *Lv et al.*

Si è dunque deciso di considerare migliori, rispetto ai modelli di letteratura, i modelli con ritardo fisico e compartimentale che si differenziano sostanzialmente nel fatto che il primo ha un buon andamento nella parte di picco e nella fase di scomparsa dell'insulina dal plasma, mentre nella parte di comparsa dell'insulina tende leggermente a sottostimare i dati nei soggetti più problematici; il secondo invece ha tendenzialmente un buon andamento nella parte di comparsa dell'insulina e nel picco ma tende spesso a sovrastimare i dati in coda. Dal punto di vista fisiologico questi modelli rispecchiano correttamente il ritardo nella comparsa dell'insulina nel plasma, probabilmente dovuto a fenomeni di diffusione. È fondamentale sottolineare comunque come il modello con ritardo compartimentale non raggiunga l'elevata complessità del modello di *Lv et al.*, mantenendo infatti un numero di compartimenti relativamente basso e risultando quindi fisiologicamente accettabile. Per quanto riguarda il modello con ritardo fisico invece, il ritardo viene semplicemente descritto come un ritardo fisico nel passaggio dell'insulina dal sito di iniezione al sito di assorbimento. Tale ritardo, come evidenziato anche nell'articolo di Rasmussen *et al.*[14], può essere dovuto alla presenza di sostanze ausiliarie che rallentano la diffusione nel tessuto sottocutaneo e può essere influenzato da diversi fattori quali la temperatura del corpo, la profondità di iniezione e la tipologia di insulina stessa.

La selezione del modello ottimo viene fatta di seguito sfruttando gli strumenti a nostra disposizione come il *runtest*, la precisione dei parametri, la bontà dei residui e la predizione del modello. Non viene utilizzato AIC perchè i modelli non sono confrontabili in quanto non tutti i parametri vengono stimati. Come abbiamo visto nelle sezioni precedenti, entrambi i modelli hanno una buona variabilità nella

stima dei parametri. Generalmente dall'analisi delle tabelle 5.4, 5.5 e 5.6 si nota come per entrambi i modelli si ha che V_i stimato è, in media, circa 0.12 L/kg e k_e è, in media, circa 0.11 min^{-1} . A differenziarsi, anche se in minima parte, sono i parametri del sottocute:

- k_{a1} viene stimato in qualche soggetto solo nel modello con ritardo fisico, esso, che rappresenta il passaggio di insulina dal sito di iniezione direttamente al plasma, è comunque molto basso (9 soggetti stimati nel data base 1, 5 soggetti stimati nel data base 2 e 16 nel database 3). Per il modello con ritardo compartimentale, questo parametro non è presente.
- k_d è il coefficiente di diffusione nel sottocute. Esso, assume un valore medio di circa 0.038 min^{-1} nel modello con ritardo fisico, mentre, nel modello con ritardo compartimentale assume valori medi intorno a 0.11 min^{-1} .
- k_{a2} , ovvero il parametro di assorbimento che, dalla letteratura, ci si aspetta abbia valori di circa 0.012 min^{-1} [14] risulta avere, in media, un valore di circa 0.015 min^{-1} per il modello con ritardo fisico, e di 0.013 min^{-1} per il modello con ritardo compartimentale.

È da sottolineare però che la precisione delle stime dei parametri nel modello con ritardo fisico è migliore di quella del modello con ritardo compartimentale, che a differenza del precedente, in alcuni parametri, risulta avere una SD maggiore rispetto al valor medio.

Riguardo la predizione dei modelli, analizzando i singoli soggetti e confrontandoli uno ad uno, si nota che tendenzialmente il modello con ritardo fisico descrive in modo migliore i dati rispetto al modello con ritardo compartimentale.

Infine si può notare che in quanto a bianchezza dei residui, il modello con ritardo fisico supera il runtest un numero maggiore di volte rispetto al modello con ritardo compartimentale, seppur la differenza di percentuale sia minima. Si nota inoltre come, soprattutto per i data set 2 e 3 la percentuale di soggetti che superano il runtest è molto alta (maggiore dell'85 %), indice della bontà del modello.

Il prossimo passo sarà dunque quello di inserire il modello con ritardo fisico scelto, all'interno del simulatore UVA/Padova dei diabetici di tipo 1 al fine di generare una nuova popolazione capace di predire con buona precisione e variabilità la cinetica di analoghi rapidi dell'insulina presenti nei diabetici di tipo 1.

Capitolo 6

Incorporazione del modello ottimo nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1

In quest'ultima parte è stato inserito il modello con ritardo fisico all'interno del simulatore UVA/Padova dei diabetici di tipo 1.

6.1 Introduzione

Negli anni la sperimentazione si è servita di modelli di simulazione per riuscire a capire meglio alcune problematiche difficili da studiare a causa della non riproducibilità in laboratorio dovuta ad alti costi o a problemi etici o ancora alle effettive condizioni difficilmente realizzabili. I modelli di vecchia generazione si basavano su misure glucosio-insulina, trascurando il fatto che una stessa misura di glucosio-insulina poteva essere indotta da flussi interni differenti.

In questa trattazione ci occuperemo principalmente del simulatore del diabete di tipo 1, messo a punto grazie alla collaborazione tra le Università di Padova e della Virginia. È importante evidenziare come questo modello sia stato costruito non solo sulla base di dati riguardanti la concentrazione di glucosio e insulina nel plasma ma anche sulla base di misure (stime) dei principali flussi post-prandiali di glucosio ottenute con la tecnica del triplo tracciante (uno per via orale durante il pasto, due per via intravenosa) sottoposta ad un data set di 204 soggetti sani. Successivamente alla realizzazione di un modello medio per il soggetto sano (figura 6.1), sulla base di informazioni tratte dalla letteratura riguardanti i soggetti diabetici di tipo 1, è stato modificato il modello e i relativi parametri fino ad una validazione del simulatore su dati ottenuti in trial clinici in soggetti diabetici di tipo 1.

CAPITOLO 6. INCORPORAZIONE DEL MODELLO OTTIMO NEL
SIMULATORE UVA/PADOVA DEL DIABETE DI TIPO 1

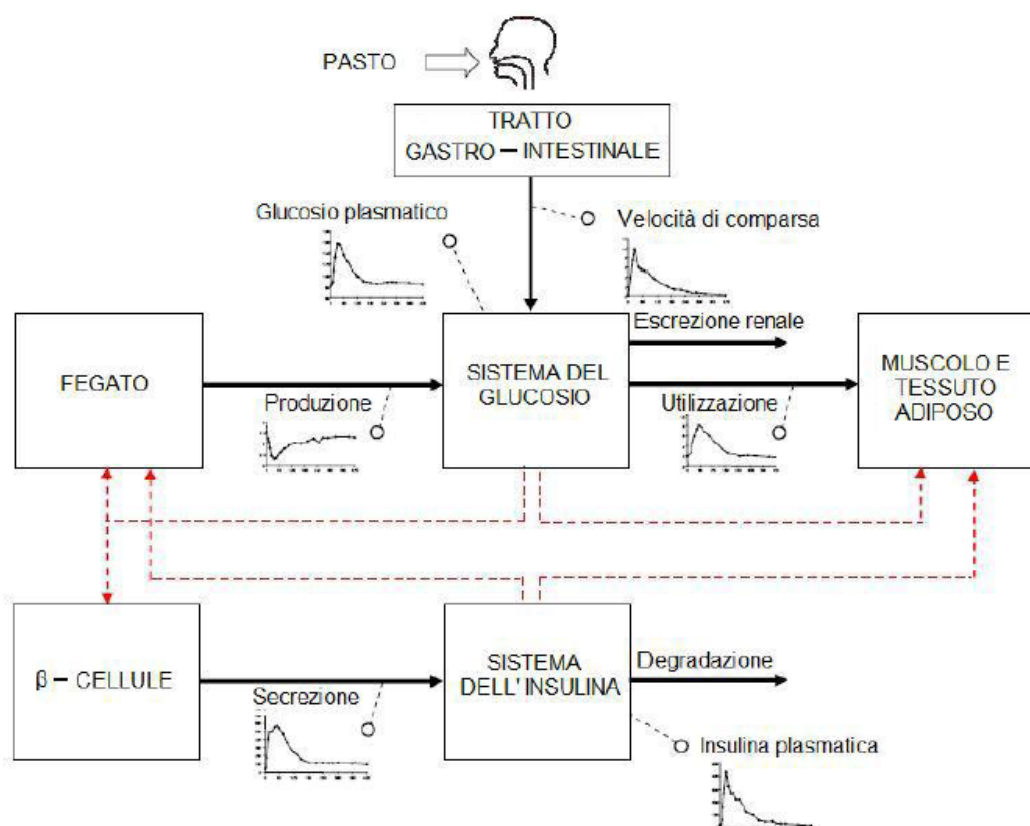


Figura 6.1: Schema del sistema glucosio-insulina nel soggetto sano.

Questo modello di simulazione è strutturato in due parti fondamentali che relazionano le concentrazioni plasmatiche di glucosio e di insulina che vengono misurate con i flussi di glucosio (velocità di comparsa R_a , produzione epatica EGP , utilizzazione ed estrazione renale E) e insulina (secrezione pancreatica S e degradazione D):

- Il sottosistema del glucosio;
- Il sottosistema dell'insulina.

In questa tesi, data la centralità del modello insulinico, ci si sofferma in dettaglio solo su questo tipo di sottosistema, ponendo l'attenzione sulla struttura del modello del soggetto diabetico, tralasciando le altre parti altresì importanti ma non fondamentali alla nostra trattazione.

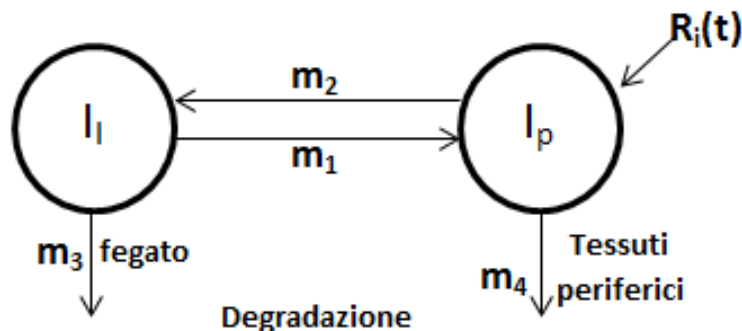


Figura 6.2: Modello compartimentale della cinetica dell'insulina plasmatica.

La cinetica plasmatica è descritta da un modello bicompartimentale (figura 6.2) descritto dalle seguenti equazioni[17]:

$$\begin{aligned}
 \dot{I}_l(t) &= -(m_1 + m_3(t))I_l(t) + m_2 I_p(t) & I_l(0) &= 0 \\
 \dot{I}_p(t) &= -(m_2 + m_4)I_p(t) + m_1 I_l(t) + R_i(t) & I_p(0) &= 0 \\
 I(t) &= \frac{I_p(t)}{V_i}
 \end{aligned} \tag{6.1}$$

dove I_p e I_l (pmol/kg) sono le masse di insulina nel plasma e nel fegato, $R_i(t)$ (pmol/kg/min) è il flusso di comparsa dell'insulina esogena nel sangue, V_i (l/kg) è il volume di distribuzione di insulina e m_1 (min^{-1}), m_2 (min^{-1}) e m_4 (min^{-1}) sono le velocità di scambio tra i compartimenti. La degradazione avviene sia nel fegato che nei tessuti periferici e in quest'ultimo caso può essere assunta lineare m_4 (min^{-1}).

Si ha inoltre che, dal momento che il fegato è responsabile per il 60% dell'estrazione di insulina in condizioni basali, HE_b viene fissato a 0.6, da qui si ha:

$$m_2 = \frac{3}{5} \frac{CL}{HE_b} (V_i * BW) \tag{6.2}$$

$$m_3(t) = \frac{HE_b(t)m_1}{1 - HE_b(t)} \tag{6.3}$$

$$m_4 = \frac{2}{5} \frac{CL}{(V_i * BW)} \tag{6.4}$$

dove BW (kg) è il peso e CL (L/min) la *clearance*.

6.2 Identificazione e risultati del modello pre-scelto

Il modello ottimo scelto per rappresentare la cinetica dell'insulina nel sottocute, come detto al capitolo precedente è il modello con ritardo fisico. Di seguito vengono presentati la struttura del modello e i risultati ottenuti dopo l'inserimento nel simulatore UVA/Padova per poi finire con la generazione di una popolazione virtuale.

6.2.1 Identificabilità del modello con ritardo fisico

Di seguito si riporta quindi la struttura di tale modello che è stata applicata alla cinetica bicompartimentale plasmatica sopra descritta.

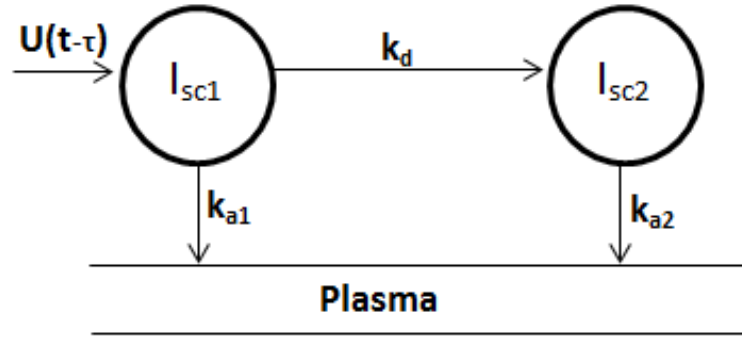


Figura 6.3: Modello della cinetica sottocutanea dell'insulina.

Il modello di figura 6.3 è descritto dalle seguenti equazioni:

$$\begin{aligned} \dot{I}_{sc1}(t) &= -(k_d + k_{a1})I_{sc1}(t) + U(t - \tau) & I_{sc1}(0) &= I_{sc1ss} \\ \dot{I}_{sc2}(t) &= k_d I_{sc1}(t) - k_{a2} I_{sc2}(t) & I_{sc2}(0) &= I_{sc2ss} \end{aligned} \quad (6.5)$$

con I_{sc1} e I_{sc2} rispettivamente quantità di insulina non monomerica e monomerica nel sottocute, $U(t)$ (U/kg) velocità di infusione di insulina esogena iniettata, $k_d(\text{min}^{-1})$ coefficiente di diffusione nel sottocute, $k_{a1}(\text{min}^{-1})$ costante di velocità di assorbimento sottocutaneo di insulina del primo compartimento e $k_{a2}(\text{min}^{-1})$ costante di velocità di assorbimento sottocutaneo di insulina del secondo compartimento. La velocità R_i di comparsa dell'insulina nel plasma è quindi data da:

$$R_i(t) = k_{a1}I_{sc1}(t) + k_{a2}I_{sc2}(t) \quad (6.6)$$

CAPITOLO 6. INCORPORAZIONE DEL MODELLO OTTIMO NEL SIMULATORE UVA/PADOVA DEL DIABETE DI TIPO 1

A livello di identificabilità, il modello globale, composto dal modello di assorbimento sottocutaneo con ritardo fisico e dal modello bicompartimentale della cinetica plasmatica, non è a priori identificabile. I parametri identificati sono quelli del sottocute con l'aggiunta dei parametri m_1 , CL e V del plasma con m_2 , m_4 e m_{30} ottenute da condizioni di stato stazionario e HE_b fissata a 0.6. Date queste premesse si è poi passati all'identificazione MAP utilizzando come prior (media e matrice di covarianza) quelli del simulatore UVA/Padova [10].

6.2.2 Stima parametrica

Di seguito vengono riportate le stime dei parametri (V_i , m_1 , CL , k_d , k_{a1} , k_{a2}) ottenute dall'identificazione del modello con ritardo fisico per i vari dataset. Nelle tabelle 6.1, 6.2 e 6.3 si evidenziano, per ogni dataset, media +/-SD ottenute.

Data Base 1	t	V_i (L/kg)	m_1 (min ⁻¹)	CL (L/min)	K_d (min ⁻¹)	K_{a1} (min ⁻¹)	K_{a2} (min ⁻¹)	SD	RUNTEST
MODELLO CON RITARDO FISICO (media +/-SD)	8,7 +/- 5,58	0,054 +/-0,010 (22+/-3)	0,17 +/-0,029 (49+/-1,12)	1,218 +/-0,31 (3+/-0,7)	0,037 +/-0,018 (15+/-17)	0,00046 +/-0,0013 Stimato in 8 soggetti (26+/-27,3)	0,014 +/-0,007 (11+/-14,9)	4,3	81,08%

Tabella 6.1: Stima parametrica: Media+/- SD Data Base1.

Data Base 2	t	V_i (L/kg)	m_1 (min ⁻¹)	CL (L/min)	K_d (min ⁻¹)	K_{a1} (min ⁻¹)	K_{a2} (min ⁻¹)	SD	RUNTEST
MODELLO CON RITARDO FISICO (media +/-SD)	7,4 +/- 5,09	0,05 +/-0,013 (21+/-3,11)	0,18 +/-0,028 (49+/-0,73)	1,10 +/-0,27 (3+/-0,95)	0,030 +/-0,016 (16+/-17,8)	0,00013 +/-0,00058 Stimato in 2 soggetti (23+/-16,9)	0,014 +/-0,005 (10+/-10,1)	4,53	83,33%

Tabella 6.2: Stima parametrica: Media+/- SD Data Base 2.

Data Base 3	t	V_i (L/kg)	m_1 (min ⁻¹)	CL (L/min)	K_d (min ⁻¹)	K_{a1} (min ⁻¹)	K_{a2} (min ⁻¹)	SD	RUNTEST
MODELLO CON RITARDO FISICO (media +/-SD)	8,6 +/- 5,29	0,04 +/-0,005 (24+/-2,04)	0,17 +/-0,015 (49+/-0,77)	1,4 +/-0,035 (4+/-1,19)	0,035 +/-0,023 (15+/-14,3)	0,00042 +/-0,0010 Stimato in 8 soggetti (21+/-7,3)	0,011 +/-0,0075 (10+/-10,1)	3,5	100%

Tabella 6.3: Stima parametrica: Media+/- SD Data Base 3.

CAPITOLO 6. INCORPORAZIONE DEL MODELLO OTTIMO NEL
SIMULATORE UVA/PADOVA DEL DIABETE DI TIPO 1

Dall'analisi dei parametri su tutti i dataset, si nota come il modello abbia una buona variabilità dei parametri, infatti l'indice SD è sempre minore della media ad esso associata. In dettaglio, notiamo che il modello, in tutti i data base, stima un V_i medio di circa $0.05 L/kg$, m_1 è in media $0.17 min^{-1}$, mentre il parametro di clearance CL si mantiene intorno a $1.2 L/min$ come ci aspettiamo dalla letteratura. Per quanto riguarda i parametri del sottocute invece, la stima del parametro k_{a2} assume, in media, valori intorno al $0.012 min^{-1}$, rispettando anche questo le nostre aspettative. Infatti, da informazioni a priori sull'assorbimento dell'insulina nel sottocute, si sa che il parametro di assorbimento, nel nostro caso k_{a2} dovrebbe assumere valori dell'ordine di $0.012 min^{-1}$ [14]. Infine il parametro k_{a1} viene stimato solo su un numero esiguo di soggetti (8 per i data base 1 e 3, 2 per il data base 2), mentre il parametro k_d assume in media valori di $0.033 min^{-1}$. Per quanto riguarda il ritardo, si nota che esso si aggira intorno agli 7-8 minuti.

Come ultima osservazione, nelle tabelle compare la percentuale di volte in cui, per quel dataset, è stato passato il *runtest*. Si discuterà di questo nella sezione successiva anche se, fin da subito notiamo che esso raggiunge percentuali molto elevate (superiori all'80%).

Confronto dei parametri del sottocute tra cinetica mono e bi-compartmentale plasmatica

In ultima analisi, nelle tabelle 6.4, 6.5 e 6.6, si propone un confronto tra le stime dei parametri del sottocute ottenuti con l'aggiunta del modello con ritardo fisico al modello della cinetica plasmatica prima mono e poi bi-compartmentale.

Data Base 1	t	Kd (min ⁻¹)	Ka1 (min ⁻¹)	Ka2 (min ⁻¹)	SD	RUNTEST
MODELLO CON RITARDO FISICO (cinetica monocompartimentale plasmatica)	7,4 +/-5,09	0,039 +/-0,027 (30+/-39,7)	0,00081 +/-0,0019 <u>Stimato in 9 soggetti</u> (20+/-24,25)	0,012 +/-0,006 (9+/-6,45)	3,63	78,3%
MODELLO CON RITARDO FISICO (cinetica bicompartimentale plasmatica)	8,7 +/-5,58	0,037 +/-0,018 (15+/-17)	0,00046 +/-0,0013 <u>Stimato in 8 soggetti</u> (26+/-27,3)	0,014 +/-0,007 (11+/-14,9)	4,3	81,08%

Tabella 6.4: Stima parametrica: Modello con ritardo fisico applicato al modello mono e bi-compartmentale del plasma, media +/-SD Data Base 1.

Dal confronto si nota una leggera differenza nella stima del ritardo τ che, nella cinetica bicompartimentale è leggermente superiore rispetto a quella della cinetica monocompartimentale. Per quanto riguarda i parametri del sottocute si nota invece come essi siano molto simili tra loro, evidenziando un valore leggermente più

CAPITOLO 6. INCORPORAZIONE DEL MODELLO OTTIMO NEL SIMULATORE UVA/PADOVA DEL DIABETE DI TIPO 1

Data Base 1	t	Kd (min ⁻¹)	Ka1 (min ⁻¹)	Ka2 (min ⁻¹)	SD	RUNTEST
MODELLO CON RITARDO FISICO (cinetica monocompartimentale plasmatica)	7,4 +/-5,09	0,039 +/-0,027 (30+/-39,7)	0,00081 +/-0,0019 <u>Stimato in 9 soggetti</u> (20+/-24,25)	0,012 +/-0,006 (9+/-6,45)	3,63	78,3%
MODELLO CON RITARDO FISICO (cinetica bicompartimentale plasmatica)	8,7 +/-5,58	0,037 +/-0,018 (15+/-17)	0,00046 +/-0,0013 <u>Stimato in 8 soggetti</u> (26+/-27,3)	0,014 +/-0,007 (11+/-14,9)	4,3	81,08%

Tabella 6.5: Stima parametrica: Modello con ritardo fisico applicato al modello mono e bi-compartimentale del plasma, media +/-SD Data Base 2.

Data Base 1	t	Kd (min ⁻¹)	Ka1 (min ⁻¹)	Ka2 (min ⁻¹)	SD	RUNTEST
MODELLO CON RITARDO FISICO (cinetica monocompartimentale plasmatica)	7,4 +/-5,09	0,039 +/-0,027 (30+/-39,7)	0,00081 +/-0,0019 <u>Stimato in 9 soggetti</u> (20+/-24,25)	0,012 +/-0,006 (9+/-6,45)	3,63	78,3%
MODELLO CON RITARDO FISICO (cinetica bicompartimentale plasmatica)	8,7 +/-5,58	0,037 +/-0,018 (15+/-17)	0,00046 +/-0,0013 <u>Stimato in 8 soggetti</u> (26+/-27,3)	0,014 +/-0,007 (11+/-14,9)	4,3	81,08%

Tabella 6.6: Stima parametrica: Modello con ritardo fisico applicato al modello mono e bi-compartimentale del plasma, media +/-SD Data Base 3.

alto di k_{a2} nel modello bicompartimentale. In ultima analisi, è immediato notare che il modello con ritardo fisico applicato al simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1 presenta un'elevata percentuale di soggetti che superano il *runtest* rispetto alla sua applicazione al modello monocompartimentale della cinetica plasmatica.

6.2.3 Analisi dei fit e dei residui pesati

Nelle figure 6.4, 6.5 e 6.6 si riportano i fit medi rispetto ai dati medi \pm SE e i corrispettivi residui pesati \pm SD del modello con ritardo fisico inserito all'interno del simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1, che possiede una cinetica bicompartimentale (un compartimento plasmatico e un compartimento epatico).

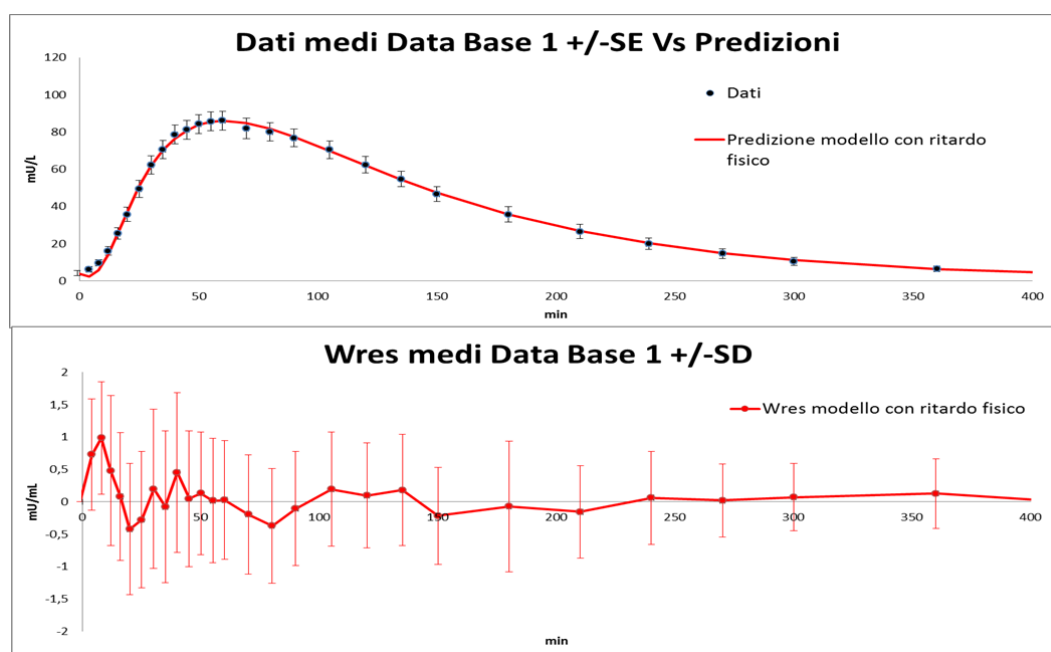


Figura 6.4: Fit e residui pesati: Modello con ritardo fisico nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1: Data Base 1.

Analizzando i risultati a disposizione si vede come generalmente il modello abbia buoni fit e abbia di conseguenza dei buoni residui pesati che appaiono bianchi e con un'ampiezza unitaria. Come era già emerso dai paragrafi precedenti nel confronto tra i nuovi modelli progettati, si nota ancora una volta come in generale il modello con ritardo fisico scelto come ottimo fitta molto bene la fase di picco e fase di scomparsa dell'insulina dal plasma a scapito di qualche soggetto in cui la fase di comparsa dell'insulina nel plasma non viene seguita al meglio. A conferma di ciò i grafici dell'andamento dei residui pesati dei quali è stato eseguito anche il *runttest* come test di bianchezza.

CAPITOLO 6. INCORPORAZIONE DEL MODELLO OTTIMO NEL SIMULATORE UVA/PADOVA DEL DIABETE DI TIPO 1

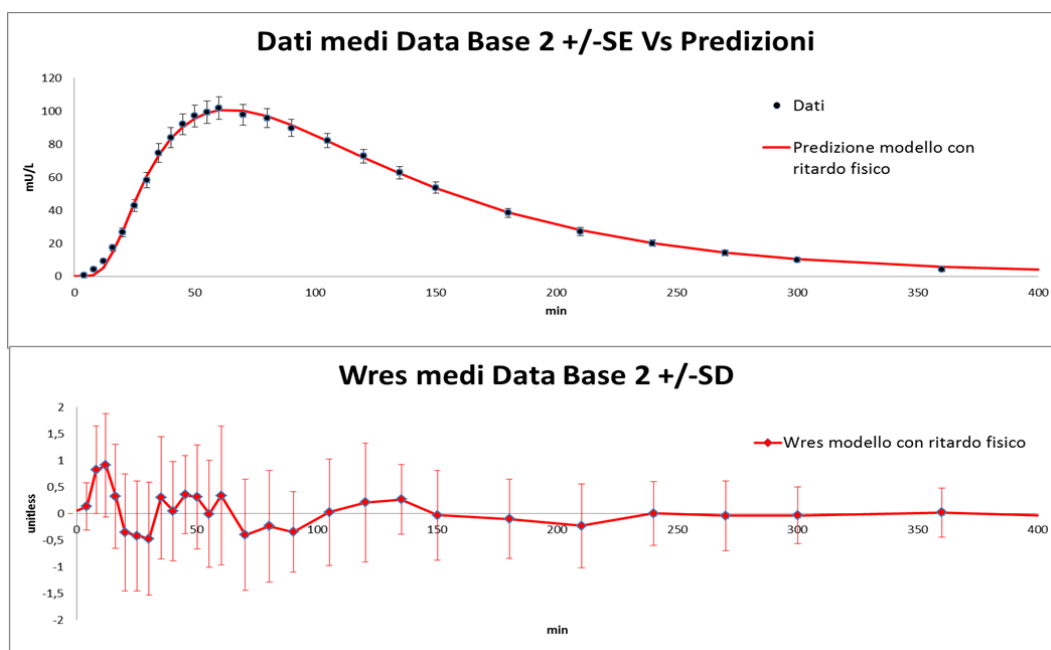


Figura 6.5: Fit e residui pesati: Modello con ritardo fisico nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1: Data Base 2.

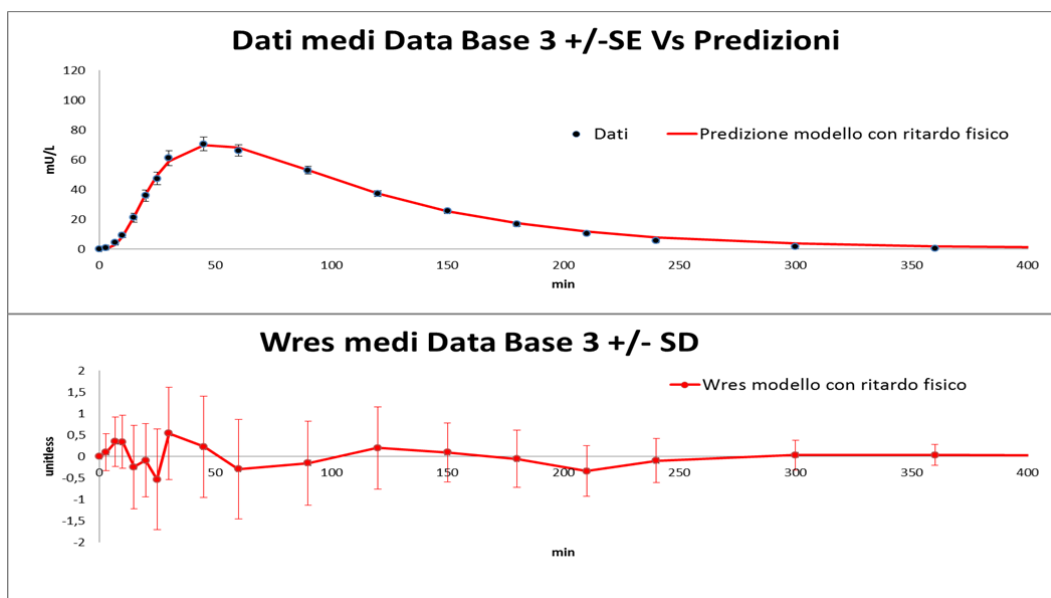


Figura 6.6: Fit e residui pesati: Modello con ritardo fisico nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1: Data Base 3.

Dalle tabelle 6.1, 6.2 e 6.3, si nota come la percentuale di soggetti che hanno passato il *runtest* sia sempre maggiore dell'80%. In particolare si nota come la minor percentuale si verifichi in corrispondenza del data set 1 probabilmente per la rumorosità dei dati iniziali dovuta all'effetto del *carry-over*. Al contrario, il data set 3, presenta percentuali molto elevate che arrivano a raggiungere il 100%, questo è sicuramente dovuto al fatto che questo data set ha una minore frequenza di campionamento.

6.2.4 Discussione

In seguito all'incorporazione del modello ottimo con ritardo fisico all'interno del simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1 si nota quindi che il modello soddisfa le nostre esigenze di descrivere al meglio la cinetica sottocutanea dell'insulina. Dall'analisi delle tabelle 6.1, 6.2 e 6.3 si vede che, generalmente il modello stima un V_i medio di circa 0.05 L/kg , un m_1 medio di circa 0.17 min^{-1} , e un parametro di *clearance* CL medio di 1.2 L/min come ci aspettiamo dalla letteratura. Per quanto riguarda i parametri del sottocute invece, la stima del parametro k_{a1} avviene solo su un numero esiguo di soggetti (8 per i data base 1 e 3, 2 per il data base 2), mentre quella di k_{a2} assume, in media, valori intorno al 0.012 min^{-1} , rispettando le nostre aspettative. Infatti, come già ribadito, da informazioni a priori sull'assorbimento dell'insulina nel sottocute, si sa che il parametro di assorbimento, nel nostro caso k_{a2} dovrebbe assumere valori dell'ordine di 0.012 min^{-1} [14]. Infine il parametro k_d assume in media valori di 0.033 min^{-1} mentre il ritardo τ si aggira intorno agli 7-8 minuti.

Per quanto riguarda i fit, si nota che il modello descrive bene le fasi di picco e di degradazione insulina che rispecchiano i dati più affidabili dell'esperimento.

Infine, si nota come anche il test di bianchezza sui dati risulti molto valido in quanto raggiunge percentuali molto alte tra l'80% e il 100%.

Andremo dunque ora a generare una popolazione virtuale utilizzando le stime dei parametri del sottocute ottenuti dall'identificazione di questo modello.

6.2.5 Generazione dei parametri di assorbimento sottocutaneo dell'insulina

Arrivati a questo punto, dopo aver scelto come modello ottimo il modello con ritardo fisico, ed averlo introdotto nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1, essendo in possesso della stima ottima dei parametri possiamo generare una popolazione virtuale sfruttando la distribuzione congiunta dei parametri.

A partire quindi dai parametri k_d , k_{a1} , k_{a2} e τ stimati delle tabelle 6.1, 6.2, 6.3, da una popolazione di 1000 soggetti, sono stati selezionati 100 soggetti con una

CAPITOLO 6. INCORPORAZIONE DEL MODELLO OTTIMO NEL SIMULATORE UVA/PADOVA DEL DIABETE DI TIPO 1

selezione random. Ad essere generati sono solo i parametri del sottocute k_d , k_{a1} , k_{a2} e τ che dovranno essere quanto più simili a quelli precedentemente ottenuti, e verranno successivamente inglobati nella popolazione esistente. I parametri del sottocute della nuova popolazione generata sono riportati nelle seguenti figure:

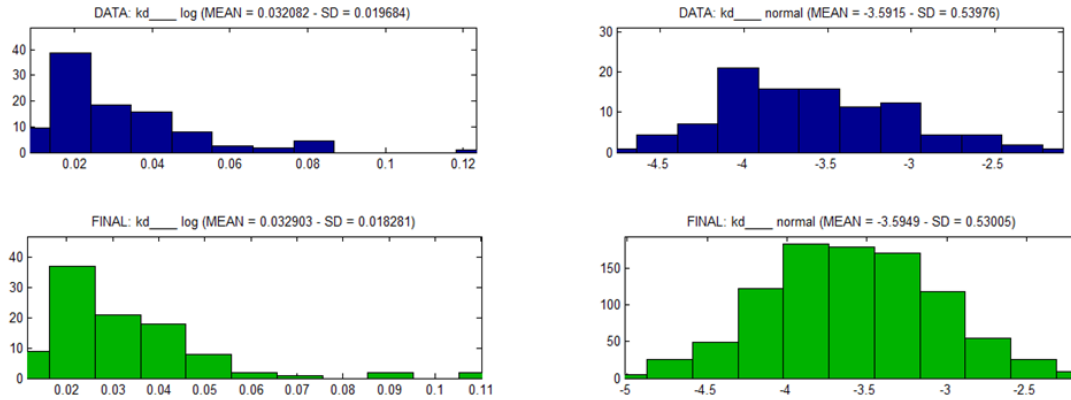


Figura 6.7: Valori di k_d nei nuovi soggetti simulati.

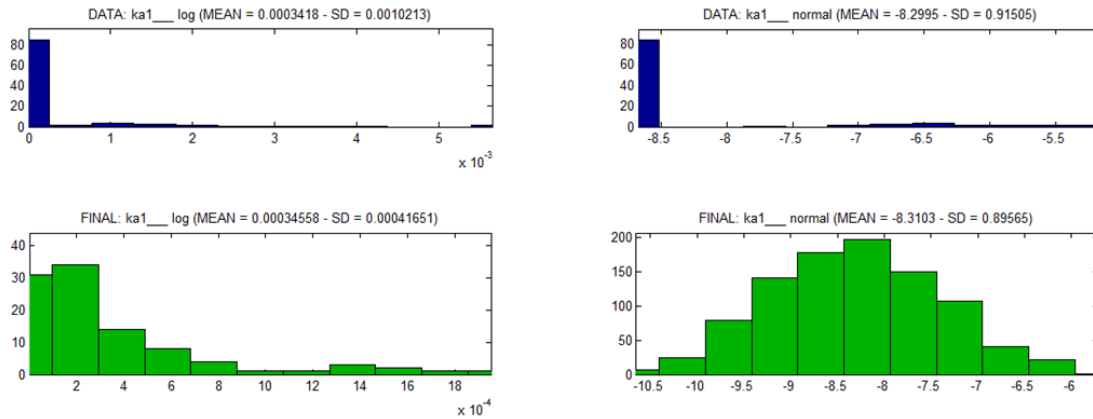


Figura 6.8: Valori di k_{a1} nei nuovi soggetti simulati.

CAPITOLO 6. INCORPORAZIONE DEL MODELLO OTTIMO NEL SIMULATORE UVA/PADOVA DEL DIABETE DI TIPO 1

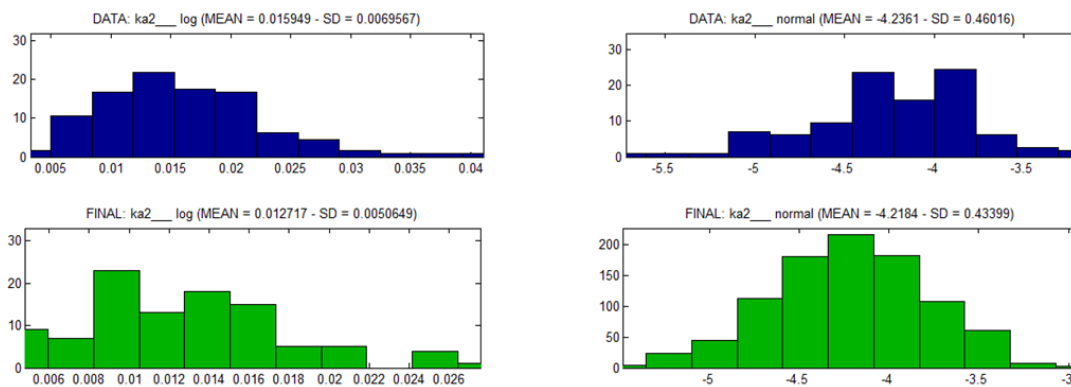


Figura 6.9: Valori di k_{a2} nei nuovi soggetti simulati.

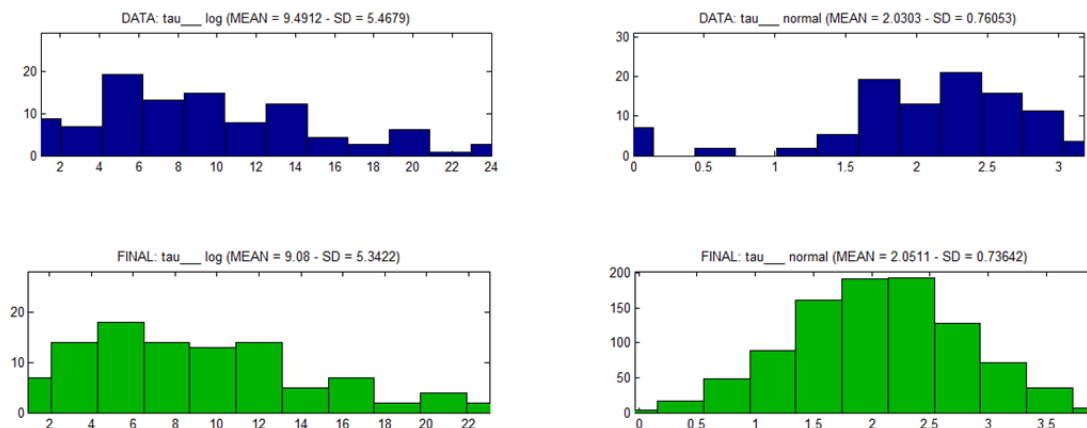


Figura 6.10: Valori di τ nei nuovi soggetti simulati.

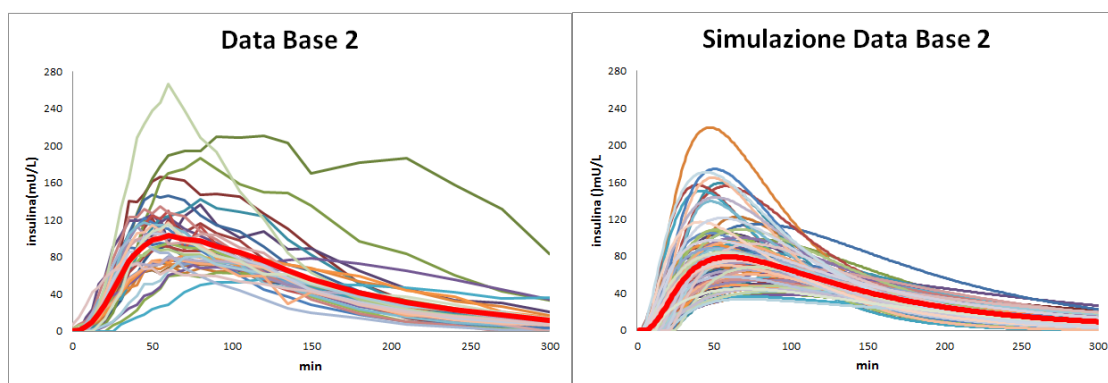


Figura 6.11: Dati veri e dati simulati a confronto: Data Base 2.

CAPITOLO 6. INCORPORAZIONE DEL MODELLO OTTIMO NEL SIMULATORE UVA/PADOVA DEL DIABETE DI TIPO 1

Come si nota dalle figure 6.7, 6.8, 6.9 e 6.10, i parametri stimati finali medi si avvicinano molto a quelli iniziali medi, non solo nei valori ma anche nelle distribuzioni. Da qui, i nuovi parametri generati del sottocute vengono sostituiti ai parametri attuali della popolazione dei 100 soggetti del simulatore, generando una nuova popolazione virtuale con una nuova descrizione dell'assorbimento sottocutaneo dell'insulina identificato da dati di analoghi rapidi.

Come ultima verifica, è stato simulato il protocollo del Data Base 2, dando una dose di 0.2 U/kg ai soggetti simulati. Da qui, sono state ottenuti i profili dei 100 soggetti simulati. Di seguito in figura 6.11, si riportano a sinistra, i dati veri del Data Base 2 con la relativa media, mentre a destra, si riportano i grafici dei 100 soggetti simulati con la media. Osservando la figura, si nota come la media sia abbastanza simile tra le due rappresentazioni in tutte e tre le fasi: nella fase di comparsa, nel picco e nella fase di scomparsa dell'insulina dal plasma.

*CAPITOLO 6. INCORPORAZIONE DEL MODELLO OTTIMO NEL
SIMULATORE UVA/PADOVA DEL DIABETE DI TIPO 1*

Capitolo 7

Conclusioni

In questo lavoro di Tesi è stato sviluppato un nuovo modello della cinetica sottocutanea dell'insulina finalizzato all'incorporazione nel simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1.

Il modello è stato identificato su 3 dataset per un numero totale di 117 soggetti. Prima di procedere con l'identificazione dei modelli è stato effettuato uno studio sull'identificabilità a priori sfruttando, dove necessario un prior per favorire l'identificabilità.

Per prima cosa sono stati analizzati i modelli già presenti in letteratura, andando a considerare i tre modelli che negli articoli sono spiccati come quelli di maggior rilievo: il modello *Dalla Man et al.*, il modello *Wilinska et al.* e il modello *Lv et al.*. Da questa analisi è risultato evidente che il modello *Dalla Man et al.* ha una stima parametrica non ottimale (molti soggetti con $CV > 100\%$) e un fit che non riesce a descrivere bene i dati, presentando un marcato ritardo nella fase di comparsa dell'insulina nel plasma. Il modello *Wilinska et al.*, era stato originariamente testato con un set di dati a campionamento rado (un campione ogni 30 min), avendo ora un dataset ampio con un campionamento fitto (circa 11 campioni nei primi 50 min) abbiamo potuto notare come questo modello non fosse ottimale per descrivere i dati a nostra disposizione. Il modello *Lv et al.* infine, pur essendo il migliore tra i tre in quanto a fit e stima parametrica (per il fatto che stima un numero maggiore di soggetti con $CV < 100\%$), presenta alcune debolezze. Esso infatti, non è a priori identificabile, e, per renderlo tale viene fissato *ad hoc* un parametro senza un corrispettivo prior dalla letteratura[13]. Inoltre, presenta un numero di compartimenti elevato ed evidentemente non fisiologico oltre che avere, per alcuni parametri, un indice di dispersione (SD) maggiore rispetto al valor centrale (media).

Da queste considerazioni, sono stati progettati due nuovi modelli sulla base del modello *Dalla Man et al.* utilizzato grazie alle sue proprietà di semplicità e identificabilità a priori. A questo modello è stato aggiunto poi un ritardo per

descrivere bene i dati, mediante ritardo fisico o compartimentale. Dall'analisi dei due nuovi modelli con ritardo è risultato che, pur essendo generalmente entrambi dei buoni modelli, presentano, il primo un buon andamento nella fase di picco e nella fase di scomparsa dell'insulina dal plasma, il secondo presenta invece un buon andamento nella fase di comparsa dell'insulina nel plasma e nella fase di picco.

Sulla base della valutazione della precisione della stima dei parametri, la bontà dei fit, del WRSS e la bianchezza dei residui pesati (*runtest*), è stato scelto come ottimo il modello con ritardo fisico. Esso infatti presenta una buona precisione nella stima dei parametri con valori che rispecchiano quelli attesi dalla letteratura (il parametro di assorbimento k_{a2} è circa 0.012 min^{-1} come ci si aspetta [14]). In particolare le fasi di picco e di scomparsa dell'insulina dal plasma, dove, la precisione dei dati è più affidabile. Infine, come già ribadito, il test di bianchezza sui residui risulta avere alte percentuali mai inferiori all' 78%.

L'ultimo step è stato quello di inserire il modello ottimo con ritardo fisico all'interno del simulatore UVA/Padova del diabete di tipo 1 ottenendo le stime parametriche e i fit sui dati dei tre data set a disposizione, testati, in questo caso, con una cinetica plasmatica bicompartimentale e non più monocompartimentale. Da qui, essendo in possesso dei parametri ottimi del sottocute, è stata generata una popolazione virtuale al fine di aggiornare la popolazione attuale del simulatore.

Bibliografia

- [1] *Diabete di tipo I*. <http://www.diabete.net/caratteristiche-cause-e-sintomi>.
- [2] *Dati diabete*. <http://www.ccm-network.it/pagina.jsp?id=node/2003>.
- [3] *Diabete nel mondo*. <http://magazine.expo2015.org/cs/Exponet/it/lifestyle/diabete-tutti-i-numeri-in-italia-e-nel-mondo>.
- [4] *Diabete:problema globale*. <http://www.diabete.com>.
- [5] C. Cobelli, R. Bonadonna, *Bioingegneria dei sistemi metabolici*, Patron Editore, Bologna, 1998.
- [6] B. Hirsch, M.D, *Insulin Analogues*, The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE, From the Department of Medicine, University of Washington School of Medicine, 2005.
- [7] *Analoghi dell'insulina*. <http://www.novodiabete.com/aspetti-moderni-della-terapia-insulinica/>.
- [8] Glianluca Nucci, Claudio Cobelli, *Models of subcutaneous insulin kinetics*, Department of Electronics and Informatics, University of Padova, 17 December 1999.
- [9] Dayu Lv, Sandip D. Kulkarni, Alice Chan, Stephen Keith, Ron Pettis, Boris P. Kovatchev, Leon S. Farhi, Marc D. Breton, *Pharmacokinetic Model of the Transport of fast-acting insulin from the subcutaneous and intradermal spaces to blood*, Journal of Diabetes Science and Technology, 2015.
- [10] Chiara Dalla Man, Claudio Cobelli *Simulatori in silico di Pancreas Artificiale*, Brixen-Chapter.
- [11] Malgorzata E. Wilinska, Ludovic J. Chassin, Helga C. Schaller, Lukas Schaupp, Thomas R. Pieber, and Roman Hovorka, *Insulin Kinetics in Type-1 Diabetes: Continuous and Bolus Delivery of Rapid Acting Insulin*, IEEE transactions on biomedical engineering, vol.52, no.1, january 2005.

- [12] Radojka M. Savic, Daniel M. Jonker, Thomas Kerbusch, Mats O. Karlsson *Implementation of a transit compartment model for describing drug absorption in pharmacokinetic studies*, 26 July 2007.
- [13] M.Campioni, G.Toffolo, R. Basu, R. A. Rizza and C. Cobelli *Minimal model assesment of hepatic insulin extraction during oral test from standard insulin kinetic parameters*, 11 August 2009.
- [14] Christian Hove Rasmussen, Rikke Meldgaard Roge, Zhulin Ma, Maria Thomsen, Rannveig Linda Thorisdottir, Jian-Wen Chen, Erik Mosekilde, Morten Colding-Jorgensen *Insulin aspart pharmacokinetics: An assessment of its variability and underlying mechanisms*, 27 May 2014.
- [15] *Gli analoghi dell'insulina*. <http://www.ausl.rn.it/Materiali/>.
- [16] Cobelli C., Foster D., Toffolo G., *Tracer kinetics in Biomedical Research: From Data to Model*, New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2000.
- [17] Dalla Man C, Micheletto F., Lv D., Breton M., Breton M., Kovatchev B., Cobelli C., *The UVA/PADOVA Type 1 Diabetes Simulator: New Features*, Journal of Diabetes Science and Technology, Jan 1, 2014.

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto il mio relatore, il professor Claudio Cobelli per avermi dato la possibilità di lavorare a questo progetto di Tesi, per la professionalità e la gentilezza costantemente dimostratemi.

Ringrazio i correlatori: professoressa Dalla Man per la sua disponibilità e cordialità e in particolare ringrazio Michele Schiavon per l'estrema disponibilità e pazienza nel seguirmi passo a passo, per avermi dato consigli preziosi e delucidazioni ogni qualvolta ne avevo bisogno.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori, ai quali dedico questa tesi perchè senza di loro non potrei essere arrivata fin qui. Grazie per avermi insegnato ad affrontare e a superare le difficoltà incontrate nella vita, grazie per la pazienza con cui mi siete stati sempre accanto nei momenti di ansia e di stress e grazie per i sacrifici che avete fatto per mantenere economicamente i miei studi.

Ringrazio mio fratello Simone e Linda per il sostegno morale anche nei momenti più bui. Grazie anche ad Anna e Emma senza le quali i miei momenti di studio non sarebbero stati gli stessi senza le loro divertenti interruzioni.

Ringrazio Andrea G. per la sua amicizia, per il supporto tecnico e morale datomi da quando lo conosco e per esserci sempre stato quando avevo più bisogno.

Ringrazio tutti i miei amici, in particolare Matteo che, anche se lontano, ha sempre saputo darmi parole di conforto, Rachele e Silvia, per la loro amicizia, i loro consigli e per esserci sempre state senza mai voltarmi le spalle.

E infine ringrazio il mio ragazzo, Andrea, per essermi sempre stato vicino, soprattutto in questo periodo. Per aver sempre creduto in me. Grazie perchè mi hai insegnato ad affrontare la vita con il sorriso. Grazie per tutti i momenti passati insieme e per tutto quello che hai fatto per me. Semplicemente grazie, perchè mille parole non basterebbero.