



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“MODELLIZZAZIONE DELLA CINETICA DEL GLUCOSIO DAL
PLASMA ALL'INTERSTIZIO IN CONDIZIONI DINAMICHE”**

**Relatore: Prof.ssa Chiara Dalla Man
Correlatore: Prof. Michele Schiavon**

Laureando/a: Erika Zagallo

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 21 luglio 2022

INDICE

ABSTRACT	1
1 INTRODUZIONE	3
1.1 Il diabete	3
1.2 Tecniche per il monitoraggio del glucosio	4
1.2.1 Sensori CGM (Continuous Glucose Monitoring)	5
1.2.2 Fattori di inaccuratezza dei sensori CGM	6
1.2.3 Fisiologia del sottocute: legame tra glucosio nel plasma e nell'interstizio	7
1.3 Scopo della tesi	9
2 DATA BASE E PROTOCOLLI	11
2.1 Soggetti	11
2.1.1 Pasto	11
2.1.2 Esercizio fisico	11
2.2 Protocolli sperimentali	11
2.2.1 Pasto	12
2.2.2 Esercizio fisico	13
2.3 Glucosio, Insulina e rapporto tracciante-tracciato	13
2.3.1 Pasto	13
2.3.2 Esercizio fisico	15
3 MODELLIZZAZIONE DELLA CINETICA DEL GLUCOSIO DAL PLASMA ALL'INTERSTIZIO	17
3.1 Struttura del modello	17
3.1.1 Procedure di fit	19
3.2 Identificazione del modello	20
3.2.1 Stima parametrica	20
3.2.2 Approccio Fisheriano: metodo dei minimi quadrati	21
3.3 Analisi statistica della varianza (ANOVA)	24
4 RISULTATI	25
4.1 Pasto	25
4.1.1 Fit contemporaneo su D ₂ e ¹³ C	25
4.1.2 Fit su D ₂	28
4.1.3 Fit su ¹³ C	31

4.1.4 Confronti tra i parametri nelle diverse procedure di fit	34
4.1.5 Risultati dell'analisi statistica della varianza (ANOVA)	36
4.2 Esercizio fisico	38
4.2.1 Fit contemporaneo su D_2 e ^{13}C	38
4.2.2 Fit su D_2	41
4.2.3 Fit su ^{13}C	44
4.2.4 Confronti tra i parametri nelle diverse procedure di fit	47
4.2.5 Risultati dell'analisi statistica della varianza (ANOVA)	50
5 CONCLUSIONI	53
BIBLIOGRAFIA	55

ABSTRACT

La valutazione quantitativa della dinamica del glucosio dal plasma al fluido interstiziale (ISF) e la stima del ritardo plasma-interstizio sono di grande importanza per determinare l'accuratezza dei sensori di glucosio sottocutanei, una componente essenziale per il controllo del diabete mellito. È stato dimostrato che, in condizioni stazionarie, la cinetica del glucosio plasma-ISF può essere descritta con un modello lineare a due compartimenti ed è stato calcolato un "tempo di equilibrio" tra plasma e ISF di 9.1 e 11.0 min rispettivamente in soggetti sani e diabetici (T1DM). Per completare il quadro della cinetica del glucosio e di conseguenza migliorare ulteriormente l'accuratezza dei sensori CGM (continuous glucose monitoring) è necessario valutare il sistema in condizioni dinamiche. L'obiettivo di questa tesi è proprio quello di analizzare il modello che approssima la cinetica del glucosio dal plasma all'interstizio durante perturbazioni di glucosio e insulina, come pasti ed esercizio fisico, sia in soggetti sani che T1DM. A tal fine, sono stati utilizzati dati appartenenti ad un database di soggetti (sani e T1DM) sottoposti a diversi protocolli sperimentali, che prevedono l'uso di differenti traccianti del glucosio ($6,6\text{-}^2\text{H}_2$ e $1\text{-}^{13}\text{C}$) e cateteri per microdialisi per la misura della concentrazione dei traccianti nel plasma e ISF. Precisamente, un protocollo sperimentale prevede l'assunzione di un pasto con diversa modalità di somministrazione, per via intravenosa (IV) o orale, l'altro prevede lo svolgimento di attività fisica, dopo l'assunzione di un pasto, e la misurazione della concentrazione di tracciante del glucosio interstiziale in due sedi diverse, nell'addome e nella gamba.

Il modello ha mostrato buone prestazioni in termini di aderenza ai dati sperimentali e precisione dei parametri stimati. Inoltre, da un'analisi statistica della varianza, nel primo protocollo sperimentale si evidenziano minime (o nulle) differenze nella cinetica plasma-ISF tra le modalità di somministrazione del glucosio (IV vs. orale), mentre per il secondo protocollo sperimentale la cinetica plasma-ISF risulta diversa tra soggetti sani e T1DM.

Capitolo 1.

INTRODUZIONE

1.1 Il diabete

Attualmente il diabete è considerato un'emergenza sanitaria globale: nel mondo le persone adulte colpite da questa malattia sono più di 537 milioni, si prevede che aumenteranno rapidamente fino a circa 643 milioni nel 2030, per toccare quota 734 milioni entro il 2045 [1]. In uno scenario così allarmante e grave, trovare le cure più efficaci ed efficienti è molto importante per garantire una qualità di vita migliore a chi è affetto da questa malattia.



Figura 1.1: Incidenza e prevalenza del diabete nel 2021. [1]

Il diabete è una malattia che colpisce la capacità del corpo di regolare la concentrazione di glucosio nel sangue (glicemia), comportando una grave alterazione nel metabolismo dei carboidrati, delle proteine e dei lipidi, a causa di un'assente produzione di insulina da parte del pancreas (diabete di tipo 1) o di un'insufficiente produzione di insulina in quantità tale da soddisfare i bisogni dell'organismo (diabete di tipo 2). È proprio dell'insulina, ormone secreto nel pancreas da un tipo specifico di cellule (le cellule- β), il compito di ridurre la quantità di glucosio nel sangue, mantenendo il suo livello nel range fisiologico di 70-180 mg/dl. Pertanto, nelle persone affette da diabete si verifica un fenomeno di iperglicemia

cronica, una condizione che, se non corretta, può sfociare nel coma chetoacidotico, oltre a indurre gravi effetti nel lungo periodo come retinopatia, nefropatia e neuropatia [2].

Esistono due tipi principali di diabete e ognuno di essi richiede trattamenti diversi.

- Il diabete di tipo 1, detto anche diabete mellito insulino-dipendente, è una malattia autoimmune cronica causata dalla distruzione delle cellule β pancreatiche. Dal momento che viene prodotta poca o nessuna insulina, le persone affette da questa tipologia di diabete, tra il 5-10% dei diabetici, hanno bisogno di una somministrazione quotidiana di insulina esogena per mantenere la concentrazione di glucosio nell'intervallo di normalità (euglicemia).
- Il diabete di tipo 2, detto anche diabete mellito non insulino-dipendente, è caratterizzato dall'incapacità dei tessuti e degli organi del corpo di utilizzare correttamente l'insulina circolante, colpisce circa il 90-95% di tutti i diabetici. I principali fattori di rischio sono le predisposizioni genetiche, l'obesità e la sedentarietà. La terapia comune comprende il monitoraggio del glucosio, una dieta sana, l'attività fisica e la somministrazione di farmaci. Anche se, almeno inizialmente e spesso per tutta la vita, questi individui potrebbero non aver bisogno di un trattamento con insulina per sopravvivere. [3]

1.2 Tecniche per il monitoraggio del glucosio

Misurazioni precise e accurate della concentrazione di glucosio hanno un ruolo chiave nella buona gestione del diabete e possono essere effettuate attraverso diverse metodologie. Il metodo più diffuso di autocontrollo domiciliare della glicemia prevede che il paziente effettui delle misurazioni capillari di glicemia diverse volte al giorno e in dipendenza dai valori misurati, dall'attività fisica svolta, dai pasti assunti, si somministri periodicamente (principalmente prima dei pasti e prima di coricarsi) dei boli d'insulina nel sottocute. I dispositivi di automonitoraggio della glicemia (SMBG), compatti e facili da usare, sono dunque strumenti fondamentali nella routine quotidiana dei pazienti diabetici. Precisamente, i pazienti ottengono un piccolo campione di sangue attraverso punture cutanee limitate, generalmente dal dito, il sangue viene messo sopra una striscia di reagenti, inserita poi in un fotometro a riflettanza, infine, il valore della concentrazione di glucosio viene visualizzato su uno schermo. Lo svantaggio principale di questi dispositivi è la velocità di campionamento dei dati: poiché la puntura del dito è invadente e dolorosa, è possibile raccogliere sole 3-4 misurazioni al giorno. A causa della scarsità di queste misurazioni, gli eventi ipoglicemici o iperglicemici pericolosi possono non essere rilevati

[4]. La necessità di avere dati frequenti sulla glicemia spinge verso una nuova generazione di dispositivi: i sensori di monitoraggio continuo della glicemia (CGM) [5].

1.2.1 Sensori CGM (continuous glucose monitoring)

I sensori CGM sono dispositivi indossabili in grado di eseguire misurazioni della concentrazione di glucosio nel liquido interstiziale tra cellule e capillari senza intaccare i vasi sanguigni, a intervalli regolari, ad esempio ogni 1-5 minuti. I dati continui offrono numerosi vantaggi perché possono essere utilizzati per implementare azioni proattive, come prevenire la potenziale ipoglicemia con l'assunzione di carboidrati o eseguire modifiche della dose di insulina per evitare future condizioni di iperglicemia. Inoltre, avvisi acustici e visivi possono avvertire chi lo indossa se il glucosio si sta spostando fuori dal range di sicurezza.

I dispositivi CGM più diffusi sono costituiti da tre elementi principali (Figura 1.2):

- un sensore che misura un segnale elettrico proporzionale alla concentrazione di glucosio interstiziale. Più in particolare, il segnale elettrico è generato da una reazione elettrochimica di glucosio-ossidasi indotta da un filamento rivestito di enzimi inserito nel sottocute addominale o del braccio;
- un trasmettitore per trasmettere il segnale;
- un ricevitore che mostra la concentrazione di glucosio all'utente. [7]



Figura 1.2: Esempio di CGM attualmente in commercio

Componenti del Dexcom G6. Il sistema include: l'applicatore automatico, il sensore (1) che monitora i livelli di glucosio interstiziale attraverso un piccolo filamento inserito appena sotto la pelle, il trasmettitore (2), fissato sopra al sensore, che invia i dati in modalità wireless al dispositivo di visualizzazione del paziente. Quest'ultimo mostra i valori del glucosio e i dati delle tendenze sul ricevitore touchscreen o sullo smart device compatibile del paziente (3). [15]

Inoltre, i sensori che monitorano continuamente il glucosio (CGM) sono fondamentali non solo per ottenere un migliore controllo generale della glicemia, ma anche per lo sviluppo del pancreas endocrino artificiale (AEP). L'AEP è un sistema che combina un CGM, un algoritmo di controllo e un dispositivo di infusione di insulina. Un prerequisito necessario per un efficace AEP è un accurato rilevamento continuo del glucosio, ottenuto da un CGM che misura il glucosio nel liquido interstiziale (ISF) attraverso sonde di rilevamento del glucosio posizionate per via sottocutanea. Mentre vengono costantemente sviluppati e perfezionati algoritmi di controllo che determinano la dose di insulina e dispositivi affidabili per la sua somministrazione (ad esempio pompe per insulina), tali iniziative sono limitate nella questione del rilevamento del glucosio: una componente iniziale critica di qualsiasi AEP efficace [14].

1.2.2 Fattori di inaccuratezza dei sensori CGM

I dispositivi CGM misurano i livelli di concentrazione di glucosio quasi continuamente, fornendo enormi vantaggi nella gestione del diabete. Tuttavia, come qualsiasi sistema di misurazione, sono interessati da errori che causano imprecisioni nelle letture fornite in output. Analizzare l'errore nelle sue diverse forme e valutarle è necessario per migliorare le prestazioni di questi strumenti e ridurre la loro imprecisione.

Le fonti che possono compromettere la precisione del sensore sono diverse, come ritardi, sostanze interferenti, derive della sensibilità ed errori di calibrazione.

Una prima fonte di errore, che verrà analizzata approfonditamente nel paragrafo successivo, è legata alla sede corporea in cui i dispositivi CGM misurano il livello di glucosio; un compartimento diverso dal plasma, il liquido interstiziale. Pertanto, a causa della dinamica tra plasma e interstizio, che è dell'ordine dei minuti, il segnale di glucosio da ISF è ritardato e distorto rispetto al segnale di glucosio nel sangue.

Una seconda fonte di errore nei sensori CGM è la trasduzione del segnale elettrochimico in un segnale elettrico. Basandosi sulla glucosio-ossidasi i sensori hanno spesso una corrente di offset. In particolare, alcune sostanze, come il paracetamolo (APAP), possono interferire con il processo generando correnti spurie quando vengono ossidate agli elettrodi del sensore. Questo effetto indesiderato provoca un aumento artificiale dei valori di glucosio misurati (che tuttavia è stato risolto nelle versioni più recenti di alcuni sensori).

Questi problemi, che possono portare alla realizzazione di sensori che non riescono a rilevare l'ipoglicemia e a sottovalutare l'iperglicemia, sono stati discussi a lungo nella

letteratura scientifica con studi che cercano di correggere la corrente del sistema operativo concentrandosi principalmente sulla calibrazione e studi che cercano di affrontare il ritardo concentrandosi sugli algoritmi di elaborazione del segnale [8] [9].

1.2.3 Fisiologia del sottocute: legame tra glucosio nel plasma e nell'interstizio

Studi sui meccanismi del trasporto transcapillare di fluidi e soluti suggeriscono che nella maggior parte dei letti vascolari, piccole sostanze idrofile, come per esempio il glucosio, attraversano la parete capillare principalmente per semplice diffusione. Pertanto, la parete capillare può essere considerata come una membrana porosa attraverso la quale avviene lo scambio passivo di soluti tra il plasma e il liquido interstiziale (ISF). È stato dimostrato che la permeabilità delle pareti dei capillari ai piccoli soluti idrofili varia considerevolmente da un letto microvascolare all'altro in seguito ai cambiamenti nell'ultrastruttura delle pareti (per esempio capillari fenestrati vs. capillari continui). Poiché la diffusione dei soluti all'interno o all'esterno del sangue dipende anche dal tempo che il sangue trascorre nei capillari, lo scambio di soluti transcapillare è influenzato dal flusso sanguigno. È stato dimostrato che l'entità dello scambio di soluti molto piccoli con elevata permeabilità capillare (es. potassio nel cuore) dipende in gran parte dall'afflusso di sangue (cioè, scambio limitato dal flusso), ma nel caso di soluti ad alto peso molecolare e bassa permeabilità capillare (es. inulina nel cuore) è stato riscontrato che lo scambio di soluti non è praticamente influenzato dal flusso sanguigno (cioè, scambio limitato dalla permeabilità). Pertanto, lo scambio transcapillare di soluti idrofili della dimensione del glucosio può essere meglio descritto come intermedio tra le due situazioni estreme. Quindi, oltre alla geometria generale del tessuto, i principali fattori che determinano lo scambio transcapillare del glucosio sembrano essere il flusso sanguigno prevalente e la permeabilità capillare al soluto.

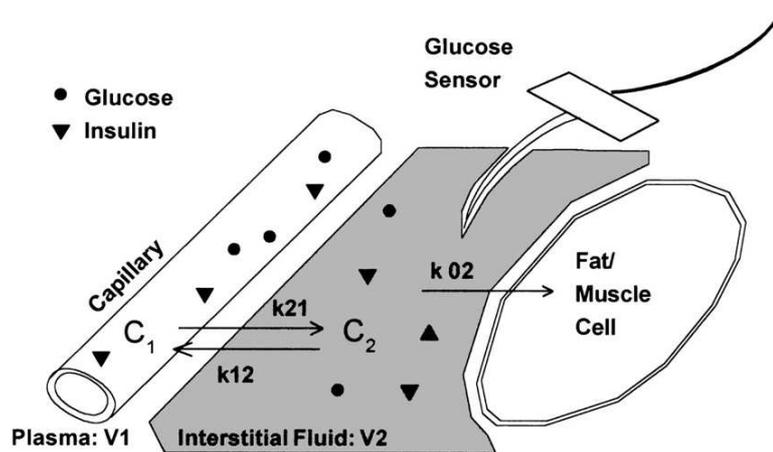


Figura 1.3: Misurazione dei livelli di glucosio dall'ISF. Modello che descrive la cinetica del glucosio nel plasma (C_1) e nel liquido interstiziale (ISF; C_2) presupponendo che il glucosio si equilibri per diffusione e sia eliminato dall'ISF dal tessuto che circonda il sensore. V_1 e V_2 rappresentano rispettivamente il volume del plasma e il volume di distribuzione dell'ISF visti dal sensore. [16]

Negli ultimi anni, l'ISF dei tessuti periferici ha ricevuto notevole attenzione come sito alternativo per la misurazione dei livelli di glucosio, poiché è facilmente accessibile e comporta un rischio di infezione inferiore rispetto al flusso sanguigno. Vari metodi, come la microdialisi, la microperfusione a flusso aperto, i sensori elettrochimici, l'estrazione transdermica e gli aghi ipodermici, sono stati proposti per la valutazione del glucosio nell'ISF piuttosto che nel sangue. I valori di glucosio ISF ottenuti con tali metodi possono quindi essere utilizzati per stimare i livelli di glucosio nel sangue e potrebbero potenzialmente sostituire le misurazioni della glicemia più invasive. Idealmente, se lo scambio transcapillare di glucosio fosse molto rapido e senza ostacoli, il sangue e il glucosio ISF sarebbero in equilibrio istantaneo in modo che le concentrazioni di glucosio ISF sarebbero identiche ai livelli ematici in ogni momento. In questa situazione ideale, la qualità nella stima delle concentrazioni di glucosio nel sangue dai valori di glucosio ISF dipenderebbe esclusivamente dal grado di precisione e accuratezza delle misurazioni di glucosio ISF. Tuttavia, in circostanze di limitato scambio transcapillare di glucosio, possono verificarsi differenze transitorie tra i livelli di glucosio ISF e variazioni delle concentrazioni di glucosio nel sangue e, se c'è un consumo aggiuntivo di glucosio da parte delle cellule dei tessuti, una differenza di concentrazione tra sangue e ISF può esistere anche in condizioni stazionarie. A causa di queste differenze, il calcolo accurato delle concentrazioni di glucosio nel sangue dalle misurazioni del glucosio interstiziale richiede di postulare un modello matematico della relazione tessuto-specifica tra i livelli di glucosio nel sangue e ISF in condizioni stazionarie e dinamiche. È stato dimostrato che, in condizioni stazionarie, la cinetica del glucosio plasma-ISF può essere descritta con un modello lineare

a due compartimenti ed è stato calcolato un "tempo di equilibrio" tra plasma e ISF di 9.1 min e 11.0 min, rispettivamente in soggetti sani e T1DM. Tali informazioni sono molto importanti, fisiologicamente e clinicamente. Una migliore comprensione di queste variabili fisiologiche è fondamentale per migliorare l'accuratezza dei dispositivi CGM, portando allo sviluppo di sensori e algoritmi di glucosio affidabili ed efficaci che potrebbero riflettere le concentrazioni di glucosio nell'ambiente della circolazione in real-time. Al contrario, un tempo di ritardo troppo lungo o troppo incoerente potrebbe rendere il glucosio interstiziale inefficace nel controllo della somministrazione di insulina [10] [11].

1.3 Scopo della tesi

Per completare il quadro della cinetica del glucosio e di conseguenza migliorare ulteriormente l'accuratezza dei sensori CGM (continuous glucose monitoring), componente essenziale dei sistemi terapeutici a ciclo aperto e chiuso per il diabete mellito di tipo 1, è necessario valutare il sistema in condizioni dinamiche.

L'obiettivo di questa tesi è proprio quello di analizzare il modello che approssima la cinetica del glucosio dal plasma all'interstizio durante perturbazioni di glucosio e insulina, come pasti ed esercizio fisico, sia in soggetti sani che T1DM. A tal fine, sono stati utilizzati dati appartenenti ad un database di pazienti (sani e con diabete di tipo 1) sottoposti a diversi protocolli sperimentali, che prevedono l'uso di traccianti del glucosio ($6,6\text{-}^2\text{H}_2$ e $1\text{-}^{13}\text{C}$) e cateteri per microdialisi che consentono di misurare frequentemente la concentrazione di tracciante nel plasma e ISF.

Il modello viene identificato e valutato secondo i criteri standard di selezione del modello, quali precisione nella stima dei parametri, bontà dei fit e bianchezza dei residui pesati. Infine, le stime dei parametri del modello vengono analizzate per valutare eventuali differenze statisticamente rilevanti tra diversi fattori di variabilità, quali presenza o meno della patologia, modalità sperimentale e tracciante utilizzato.

In particolare, una descrizione completa dei dati disponibili e dei protocolli sperimentali è fornita nel capitolo 2. Nel capitolo 3 il modello viene illustrato nel dettaglio e vengono descritte le procedure di identificazione. I risultati ottenuti vengono analizzati e sottoposti ad un'analisi statistica nel capitolo 4. Infine, le conclusioni sono riassunte nel capitolo 5.

Capitolo 2.

DATA BASE E PROTOCOLLI

In questo capitolo vengono descritti il data base contenente i dati dei soggetti e lo specifico design sperimentale a cui sono stati sottoposti ai fini di studiare il sistema in condizioni dinamiche. In particolare, questo studio è stato possibile grazie ad un set di dati unico progettato in collaborazione con la clinica Mayo Clinic in Rochester (MN, USA) presso la quale sono stati analizzati individui sani e T1DM con tecniche che includono l'uso di traccianti del glucosio ($6,6\text{-}^2\text{H}_2$ e $1\text{-}^{13}\text{C}$) e cateteri per microdialisi. Questo ha consentito di misurare frequentemente la concentrazione di traccianti sia nel plasma che ISF, insieme a glucosio ed insulina misurati frequentemente nel plasma.

2.1 Soggetti

2.1.1 *Pasto*

La coorte di studio è composta da 10 individui sani, 4 uomini e 6 donne, di età 47.3 ± 8.6 anni, peso 81.6 ± 17.3 kg, indice di massa corporea 27.7 ± 3.2 kg/m² e 10 individui diabetici di tipo 1, 5 uomini e 5 donne, di età 49.1 ± 10.4 anni, peso 76.6 ± 17.8 kg, indice di massa corporea 26.2 ± 5.4 kg/m².

2.1.2 *Esercizio fisico*

La coorte di studio è composta da 7 individui sani, 2 uomini e 5 donne, di età 53.6 ± 5.9 anni, peso 79.6 ± 19.5 kg, indice di massa corporea 27.6 ± 4.1 kg/m² e 7 individui diabetici di tipo 1, 5 uomini e 2 donne, di età 49.9 ± 12.0 anni, peso 86.8 ± 19.2 kg, indice di massa corporea 29.1 ± 5.8 kg/m².

2.2 Protocolli sperimentali

Per raccogliere contemporaneamente e frequentemente dati su plasma e ISF è stato utilizzato uno specifico design sperimentale che combina la somministrazione di più traccianti, gli isotopi stabili [$1\text{-}^{13}\text{C}$] e [$6,6\text{-}^2\text{H}_2$], quest'ultimo è rappresentabile anche con il simbolo D₂, con la tecnica di microdialisi in soggetti sani e T1DM. Tutti i soggetti sono

stati studiati utilizzando quattro cateteri per microdialisi inseriti nel tessuto adiposo sottocutaneo addominale adiacenti a due dispositivi CGM. A intervalli periodici, durante tutto il periodo di studio, sono stati raccolti campioni timed-pooled di effluenti di microdializzato e campioni di sangue nel plasma per le misurazioni di glucosio, dei traccianti e di ormoni.

2.2.1 Pasto

Il gruppo di 10 soggetti sani e 10 T1DM è stato sottoposto a due protocolli sperimentali che prevedono la simulazione di un pasto secondo diversa modalità di somministrazione: per iniezione intravenosa (IV-Meal) e somministrazione orale (Oral-Meal).

Iniezione endovenosa (IV-Meal)

Verso le 7:00 del mattino è iniziata un'infusione costante, fino ad un'ora prima della fine dello studio, di [6,6-²H₂]-glucosio per via endovenosa. Dopo 3 ore (ore 10:00) fino alle 16:00 circa è stata avviata un'infusione endovenosa "prandiale" di [1-¹³C]-glucosio e glucosio non marcato, secondo uno schema che simula la velocità di comparsa di 50 grammi di carico di glucosio orale. Contemporaneamente, nei soggetti T1DM, l'infusione notturna di insulina è stata interrotta e sostituita con un'infusione endovenosa di insulina a velocità variabile, fino alle 16:00, che imita il pattern "normale" non diabetico di secrezione di insulina a seguito di un carico di glucosio orale di 50 grammi. Verso le 15:00, l'infusione endovenosa di [6,6-²H₂]-glucosio è stata interrotta. Al termine dello studio, alle 16:00 circa, tutte le infusioni sono state interrotte, i cateteri per microdialisi endovenosi e i dispositivi CGM rimossi.

Somministrazione orale (Oral-Meal)

Ciascun soggetto è stato studiato utilizzando lo stesso protocollo descritto precedentemente con alcune differenze. In particolare, alle ore 10:00 del mattino nei soggetti sani è stato somministrato per via orale un pasto misto contenente 50 grammi di destrosio marcato con [1-¹³C]-glucosio, ugualmente nei soggetti T1DM ma con l'aggiunta di un bolo di insulina somministrato con un microinfusore secondo il consueto rapporto insulina:carboidrati per coprire il pasto.

2.2.2 Esercizio fisico (*Abdomen-Exercise e Leg-Exercise*)

In questo protocollo sperimentale, che prevede lo studio della cinetica plasma-interstizio del glucosio durante attività fisica, ai 7 soggetti sani e 7 T1DM sono state misurate concentrazioni di glucosio interstiziale in due sedi diversi, nell'addome e nella gamba, mediante la microdialisi.

Ogni paziente è stato analizzato utilizzando lo stesso design sperimentale descritto nel "Pasto: Somministrazione orale" con l'aggiunta del test V_{O_2} max sulla cyclette. Tutti i soggetti, a partire dalle ore 12.00, hanno usato una cyclette per 60 minuti ad un livello di attività del 40-60% V_{O_2} max.

2.3 Glucosio, Insulina e rapporto tracciante-tracciato

In questo paragrafo vengono mostrati i grafici relativi agli andamenti temporali medi del glucosio e dell'insulina nel plasma e del rapporto tracciante-tracciato (TTR), sia nel plasma che nel fluido interstiziale, per tutti i protocolli sperimentali, sia in pazienti sani che T1DM.

2.3.1 Pasto

Come descritto nel paragrafo precedente, il "protocollo pasto" è stato svolto con due set-up sperimentali diversi, tramite infusione intravenosa e via orale. Nelle figure sottostanti si possono osservare gli andamenti temporali medi della concentrazione del glucosio e dell'insulina nel plasma e il rapporto tracciante-tracciato sia nel caso del $6,6\text{-}^2\text{H}_2$ che del ^{13}C .

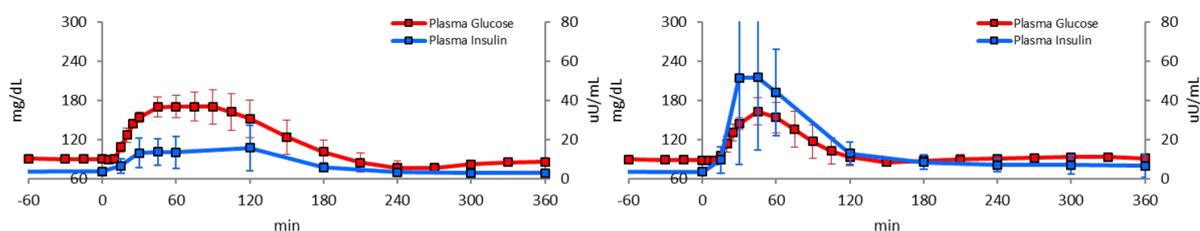


Figura 2.3a: Concentrazione del glucosio e dell'insulina nel plasma, a sinistra per la modalità di somministrazione endovenosa (IV-Meal) e a destra per quella orale (Oral-Meal) nei soggetti sani.

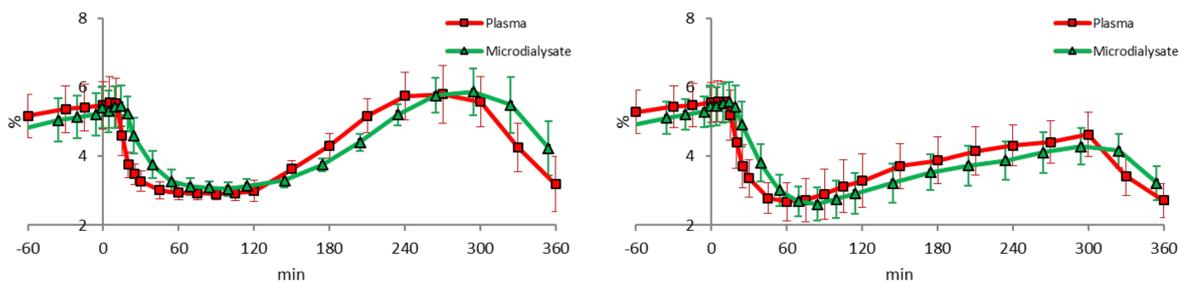


Figura 2.3b: D_2 [%] a sinistra per la modalità di somministrazione endovenosa (IV-Meal) e a destra per quella orale (Oral-Meal) nei soggetti sani.

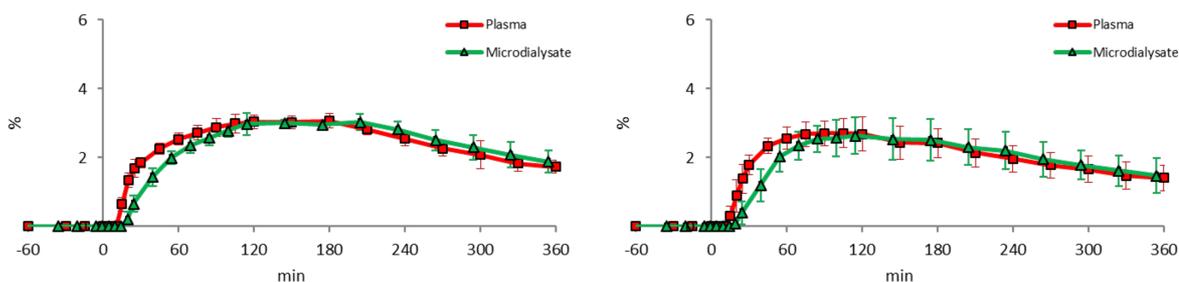


Figura 2.3c: ^{13}C [%] a sinistra per la modalità di somministrazione endovenosa (IV-Meal) e a destra per quella orale (Oral-Meal) nei soggetti sani.

Analogamente per i soggetti diabetici T1DM.

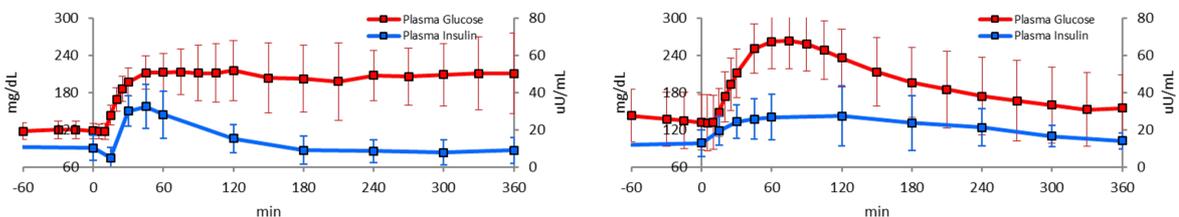


Figura 2.4a: Concentrazione del glucosio e dell'insulina nel plasma, a sinistra per la modalità di somministrazione endovenosa (IV-Meal) e a destra per quella orale (Oral-Meal) nei soggetti diabetici.

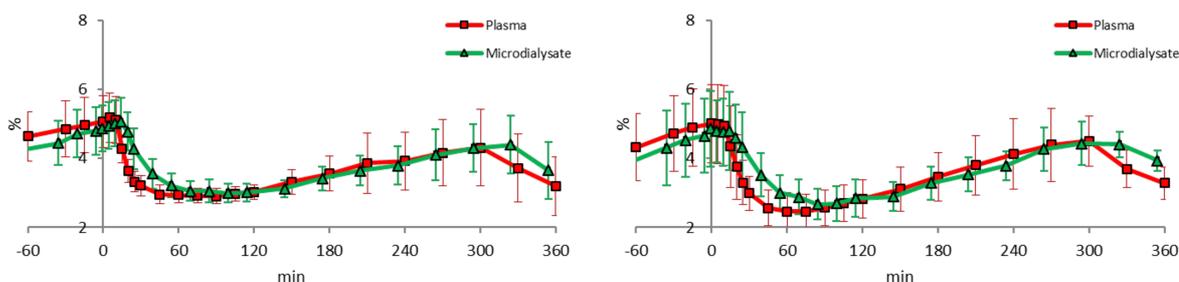


Figura 2.4b: D_2 [%] a sinistra per la modalità di somministrazione endovenosa (IV-Meal) e a destra per quella orale (Oral-Meal) nei soggetti diabetici.

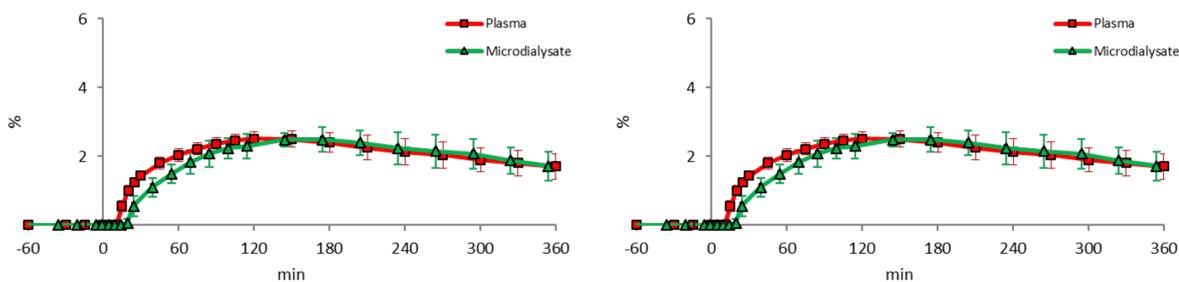


Figura 2.4c: ^{13}C [%] a sinistra per la modalità di somministrazione endovenosa (IV-Meal) e a destra per quella orale (Oral-Meal) nei soggetti diabetici.

2.3.2 Esercizio fisico

Per il protocollo che prevede lo svolgimento di attività fisica, come spiegato precedentemente, sono state misurate concentrazioni dei traccianti di glucosio nell'interstizio in due sedi diverse, nell'addome e nella gamba. In particolare, nelle seguenti figure si possono osservare gli andamenti temporali medi della concentrazioni di glucosio e insulina nel plasma e i rapporti traccianti-tracciato, sia per il D_2 che per il ^{13}C .

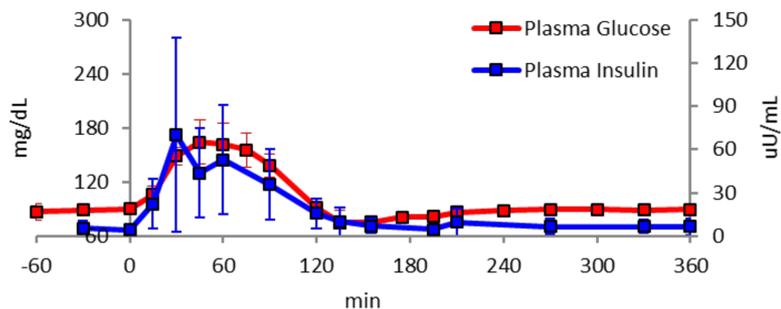


Figura 2.5a: Concentrazione del glucosio e dell'insulina nel plasma nei soggetti sani.

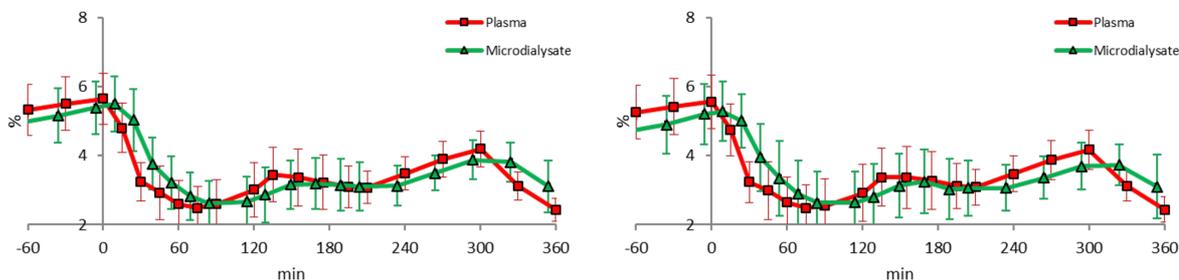


Figura 2.5b: D_2 [%] a sinistra per le misurazioni dall'addome e a destra per quelle eseguite sulla gamba nei soggetti sani.

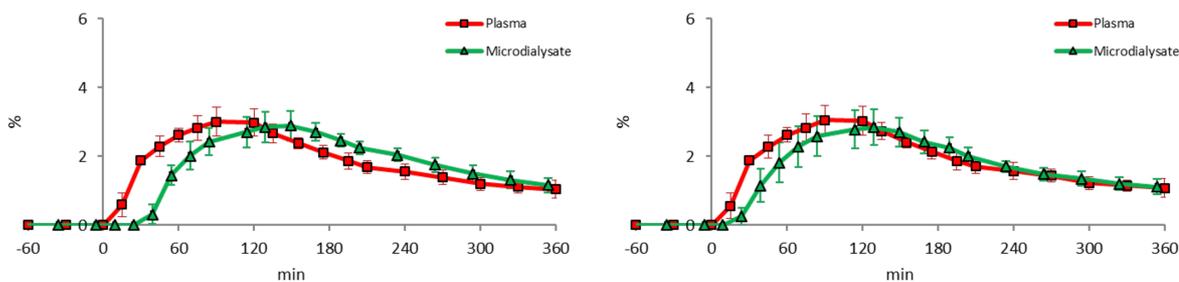


Figura 2.5c: ^{13}C [%] a sinistra per le misurazioni dall'addome e a destra per quelle eseguite sulla gamba nei soggetti sani.

Analogamente per i soggetti diabetici T1DM, è importante specificare che l'andamento medio dell'insulina nel plasma è stato definito senza i dati relativi alla concentrazione di insulina in 2 soggetti, in quanto mancanti.

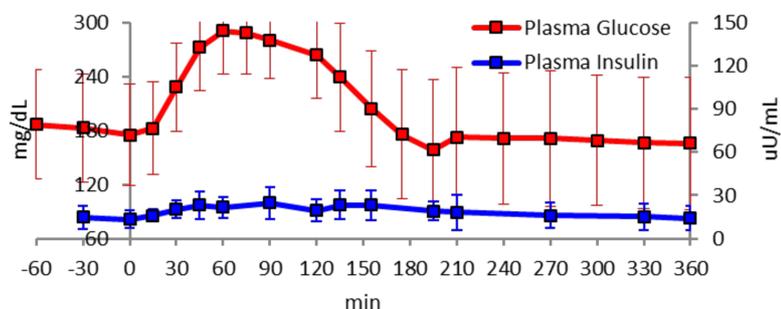


Figura 2.6a: Concentrazione del glucosio e dell'insulina nel plasma nei soggetti diabetici.

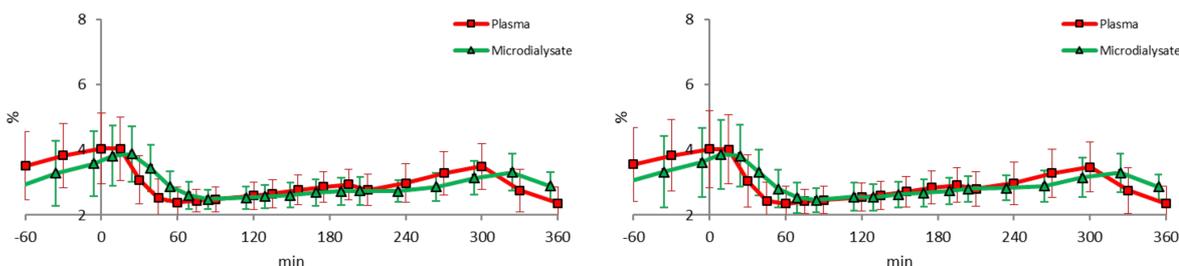


Figura 2.6b: D_2 [%] a destra per le misurazioni dall'addome e a sinistra per quelle eseguite sulla gamba nei soggetti diabetici.

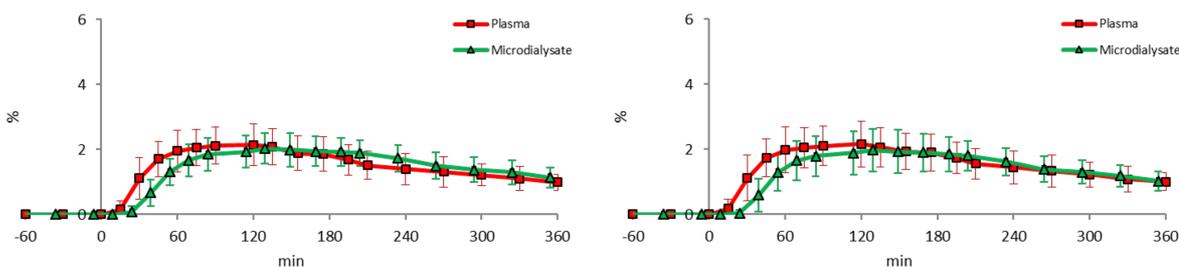


Figura 2.6c: ^{13}C [%] a destra per le misurazioni dall'addome e a sinistra per quelle eseguite sulla gamba nei soggetti diabetici.

Capitolo 3.

MODELLIZZAZIONE DELLA CINETICA DEL GLUCOSIO DAL PLASMA ALL'INTERSTIZIO

In questo capitolo viene presentato il modello e vengono spiegate le procedure di identificazione utilizzate.

3.1 Struttura del modello

Per descrivere la cinetica del glucosio dal plasma all'interstizio in condizioni dinamiche un modello lineare monocompartimentale per descrivere la cinetica del glucosio nell'interstizio, come in [11], usando il segnale del glucosio (e suo tracciante) nel plasma come funzione forzante (Figura 3). Gli input, assunti come funzione forzante (FORCING FUNCTION), sono:

- le concentrazioni dei traccianti nel plasma (Plasma [6,6-²H₂]-glucosio e [¹³C]-glucosio (q_p));
- la concentrazione di glucosio nel plasma (Q_p).

Gli output del sistema (w_i) sono i rapporti tracciante-tracciato (TTR) nell'interstizio sia di [6,6-²H₂]-glucosio che [¹³C]-glucosio.

In particolare:

- la concentrazione di glucosio interstiziale viene simulata dalla concentrazione di glucosio plasmatico (usata come FORCING FUNCTION) mediante lo stesso modello;
- si tiene conto del tempo morto del catetere, che consiste nel ritardo intrinseco introdotto dal catetere per microdialisi stesso (5.795 min per il protocollo sperimentale del pasto e 6.0 min e per quello dell'esercizio fisico);
- La misura del TTR nella microdialisi è ottenuta mediante time-pooling di 5 minuti, che quindi viene approssimata del modello come la media integrale di 5 minuti;

Per quanto riguarda l'errore di misura del TTR sia assume un errore scorrelato, a media nulla e deviazione standard (SD) costante e non nota, stimata a posteriori per ciascun tracciante.

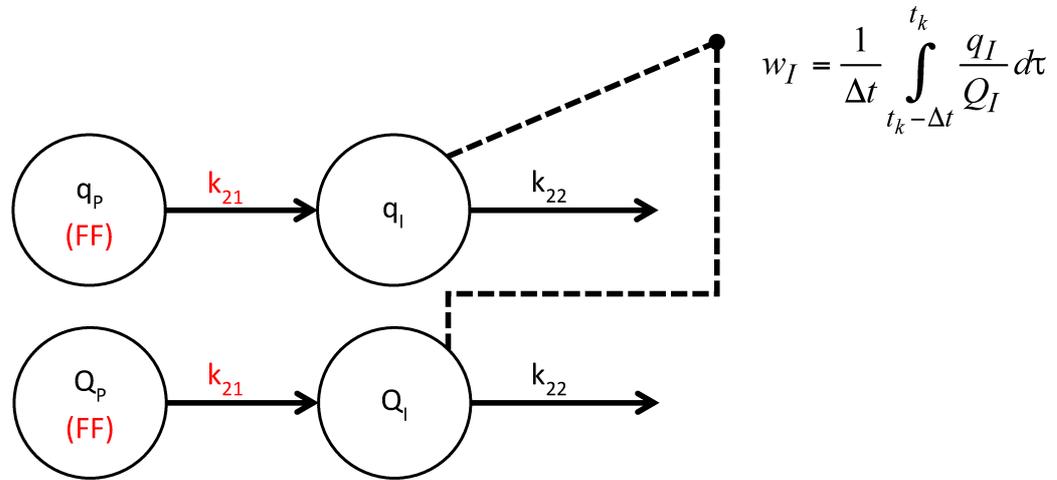


Figura 3: Schema del modello della cinetica del glucosio dal plasma all'interstizio in condizioni dinamiche.

Le due equazioni differenziali che descrivono il modello sono:

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{q}_I = -k_{22} \cdot q_I + k_{21} \cdot q_P \\ \dot{Q}_I = -k_{22} \cdot Q_I + k_{21} \cdot Q_P \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} q_I(0) = \frac{k_{21}}{k_{22}} \cdot q_{I,b} \\ Q_I(0) = \frac{k_{21}}{k_{22}} \cdot Q_{P,b} \end{array} \right. \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \dot{g}_I = -k_{22} \cdot g_I + \frac{\dot{k}_{21}}{k_{21}} \cdot g_I + q_P \\ \dot{G}_I = -k_{22} \cdot G_I + \frac{\dot{k}_{21}}{k_{21}} \cdot G_I + Q_P \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} g_I(0) = \frac{q_{I,b}}{k_{22}} \\ G_I(0) = \frac{Q_{P,b}}{k_{22}} \end{array} \right.$$

Si può notare che è stato effettuato un cambio di variabili $\rightarrow g = q/k_{21}$, dove k_{21} non è identificabile e viene assunto costante.

L'obiettivo dell'identificazione del modello consiste nella stima del parametro k_{22} [min^{-1}] che compare nelle equazioni. Precisamente, è dato dalla somma di k_{12} [min^{-1}] e k_{02} [min^{-1}], parametri che assumono un preciso significato fisiologico; k_{12} è la costante di velocità che descrive lo scambio di glucosio tra plasma e ISF [min^{-1}] e k_{02} è la costante di velocità che descrive il trasporto transmembrana netto cellula-ISF.

Durante l'applicazione dei protocolli sperimentali precedentemente descritti sono stati raccolti periodicamente campioni di microdialisi e di plasma. Si hanno così a disposizione i dati sui quali verrà implementata la procedura di identificazione, descritta nei paragrafi successivi, per ottenere i valori del parametro.

A partire dai risultati ottenuti viene calcolato anche l'half-life [min], ossia l'emivita, definito come il tempo richiesto per dimezzare la concentrazione della sostanza studiata dal sito di misura e ottenuto con la seguente formula: $\frac{\ln(2)}{k_{22}}$.

3.1.1 Procedure di fit

Per testare che non ci siano differenze a livello di parametri stimati a seconda dei dati che vengono utilizzati sono state eseguite diverse identificazioni. Precisamente, per ciascuno dei protocolli sperimentali precedentemente descritti, pasto ed esercizio fisico, sono state eseguite le identificazioni con diverse procedure di fit:

- su entrambi i traccianti contemporaneamente, D₂ e ¹³C;
- solo su D₂;
- solo su ¹³C.

Per poter fare questo, nel codice MATLAB® le variabili devono essere inizializzate nel seguente modo:

Fit contemporaneo su D₂ e ¹³C

```
%Data_fit (0=both D2&13C; 1=13C; 2=D2)
struct.data_fit=0;
%Measurement fit (0=standard; 1=SAAM for multiple fit)
struct.fit=1;
%Initial conditions
struct.initial_conditions=1;
```

Fit su D₂

```
%Data_fit (0=both D2&13C; 1=13C; 2=D2)
struct.data_fit=2;
%Measurement fit (0=standard; 1=SAAM for multiple fit)
struct.fit=0;
%Initial conditions
struct.initial_conditions=1;
```

Fit su ¹³C

```
%Data_fit (0=both D2&13C; 1=13C; 2=D2)
struct.data_fit=1;
%Measurement fit (0=standard; 1=SAAM for multiple fit)
struct.fit=0;
%Initial conditions
struct.initial_conditions=0;
```

In quest'ultimo caso, a differenza degli altri due, le condizioni iniziali non devono essere stimate perché $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosio non è presente nell'organismo prima del tempo $t=0$ s, dunque parte dal valore zero.

3.2 Identificazione del modello

3.2.1 Stima parametrica

Le equazioni del modello precedentemente presentato derivano da conoscenze fisiologiche riguardanti il sistema endocrino-metabolico di regolazione glucosio-insulina e da alcune ipotesi teoriche. Una volta definite le equazioni che descrivono il sistema è, però, necessario completare il modello assegnando dei valori numerici ai suoi parametri. Questo processo viene definito "identificazione del modello" e si realizza sfruttando la disponibilità di uno o più segnali di misura in risposta ad un ingresso noto. In generale, assumendo una struttura del modello priva di errori, il segnale misurabile $y(t)$ può essere espresso come

$$y(t) = g(t, \mathbf{p}) \quad (\text{Eq. 3.1})$$

dove la funzione $g(\cdot)$ dipende dalle specifiche equazioni del modello e $\mathbf{p} = [p_1, \dots, p_M]^T$ è il vettore contenente gli M parametri del modello incogniti. In pratica, solo N campioni di $y(t)$, raccolti ai tempi $\{t_1, \dots, t_N\}$, sono normalmente disponibili. Poiché i campioni sono corrotti da diverse fonti di rumore, compreso l'errore di misura, si può considerare il seguente modello per descrivere la misura k -esima z_k :

$$z_k = y(t_k) + v_k = g(t_k, \mathbf{p}) \quad k = 1, \dots, N \quad (\text{Eq. 3.2})$$

dove v_k denota l'errore (additivo) che influisce sulla k -esima misura z_k . Questo errore è solitamente modellabile come una variabile casuale con media nulla e spesso sono disponibili alcune informazioni statistiche sul processo casuale dato dalla collezione $\{v_k\}$. Ad esempio, $\{v_k\}$ può essere un processo stazionario non correlato con varianza σ^2 . In alcuni casi, ogni campione di $\{v_k\}$ ha un diverso livello di varianza σ^2 . La varianza σ^2 è spesso nota, o nota a prescindere da un fattore di scala, da studi precedenti effettuati sul processo di misurazione oppure può essere stimata a posteriori sotto particolari assunzioni. A volte la varianza dell'errore di misurazione dipende dalla misurazione stessa, ad esempio, per la situazione a coefficiente di variazione costante (CV) si ha

$$\sigma_k^2 = [CV y(t_k)]^2 = [CV g(t_k, \mathbf{p})]^2 \quad (\text{Eq. 3.3})$$

dove CV è un reale positivo.

Definendo $z = [z_1, \dots, z_N]^T$, $G(\mathbf{p}) = [g(t_1, \mathbf{p}), \dots, g(t_N, \mathbf{p})]^T$ e $v = [v_1, \dots, v_N]^T$, l'equazione può essere scritta in notazione vettoriale come

$$\mathbf{z} = \mathbf{y} + \mathbf{v} = \mathbf{G}(\mathbf{p}) + \mathbf{v} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

In quest'ultima equazione (Eq 3.4), la matrice di covarianza del vettore v , cioè $\Sigma_v = E[\mathbf{v}\mathbf{v}^T]$ può sempre essere descritta come

$$\Sigma_v = \sigma^2 \mathbf{B} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

dove σ^2 è un opportuno parametro scalare, noto o incognito, e \mathbf{B} è una matrice di N-dimensionale nota che può assumere i seguenti valori:

- $\mathbf{B} = \mathbf{I}_N$, se la varianza del rumore è costante e uguale a σ^2 ;
- $\mathbf{B} = \text{diag}(z_1, z_2, \dots, z_N)$, ossia \mathbf{B} contiene le misure al quadrato quando il CV è costante e uguale a sigma;
- A volte si assume che \mathbf{B} contenga le previsioni del modello al quadrato $\{y_k\}$ invece delle misure $\{z_k\}$, con la conseguenza che la procedura di stima diventa più complessa perché \mathbf{B} dipende dal vettore dei parametri incogniti \mathbf{p} .

Formalmente, il problema della stima dei parametri consiste nel determinare una stima $\hat{\mathbf{p}}$ del vettore \mathbf{p} vero e incognito, dal vettore di misura \mathbf{z} . Può essere affrontato, tra i vari metodi, con un approccio Fisheriano che presume che un certo "deterministico" valore di \mathbf{p} esiste.

3.2.2 Approccio Fisheriano: metodo dei minimi quadrati

Dato un valore generico del vettore dei parametri incogniti \mathbf{p} , utilizzando il modello, è possibile calcolare, ai tempi di campionamento dati $\{t_k\} k=1, \dots, N$, l'output del sistema in risposta a qualsiasi input e infine ottenere il vettore di N-dimensionale $\mathbf{G}(\mathbf{p})$ delle cosiddette previsioni del modello. Per il valore di prova considerato \mathbf{p} , il vettore di errore di previsione $\mathbf{e}(\mathbf{p})$ è definito come:

$$\mathbf{e}(\mathbf{p}) = \mathbf{z} - \mathbf{G}(\mathbf{p}) \quad (\text{Eq. 3.6})$$

E fornisce una sorta di "distanza" fra il vettore delle misure \mathbf{z} e la predizione del modello $\mathbf{G}(\mathbf{p})$, per quel valore di \mathbf{p} . Un approccio naturale per quantificare la bontà del modello, comprendente equazioni e il valore numerico di \mathbf{p} , è minimizzare la norma al quadrato di

$$J_{LS}(\mathbf{p}) = [\mathbf{z} - \mathbf{G}(\mathbf{p})]^T \mathbf{B}^{-1} [\mathbf{z} - \mathbf{G}(\mathbf{p})] \quad (\text{Eq. 3.7})$$

In effetti, più piccolo è $J_{LS}(\mathbf{p})$ più, il modello specificato, aderisce ai dati. Nell'Eq. (3.7), la matrice di pesatura \mathbf{B} permette di tener conto che il dato $\{z_k\}$ può essere affetto da errore

con varianza eventualmente diversa, cioè, minore è il rumore atteso su un dato, maggiore dovrebbe essere l'aderenza della previsione del modello ad esso.

Tuttavia, \mathbf{p} nell'Eq. (3.7) non è noto. La stima dei minimi quadrati (LS) determina $\hat{\mathbf{p}}_{LS}$ minimizzando $J_{LS}(\mathbf{p})$. Formalmente

$$\hat{\mathbf{p}}_{LS} = \operatorname{argmin}_{\mathbf{p}} J_{LS}(\mathbf{p}) \quad (\text{Eq. 3.8})$$

Se $\mathbf{G}(\mathbf{p})$ dipende linearmente da \mathbf{p}

$$\mathbf{G}(\mathbf{p}) = \mathbf{G}\mathbf{p} \quad (\text{Eq. 3.9})$$

essendo \mathbf{G} un'opportuna matrice $M \times N$, la funzione di costo nell'Eq. (3.9) diventa

$$\hat{\mathbf{p}}_{LS} = \operatorname{argmin}_{\mathbf{p}} [\mathbf{z} - \mathbf{G}\mathbf{p}]^T \mathbf{B}^{-1} [\mathbf{z} - \mathbf{G}\mathbf{p}] \quad (\text{Eq. 3.10})$$

e, grazie alla sua forma quadratica, esiste una soluzione analitica, data da

$$\hat{\mathbf{p}}_{LS} = (\mathbf{G}^T \mathbf{B}^{-1} \mathbf{G})^{-1} \mathbf{G}^T \mathbf{B}^{-1} \mathbf{z} \quad (\text{Eq. 3.11})$$

Poiché, in questo caso, $\mathbf{G}(\mathbf{p})$ dipende in modo non lineare da \mathbf{p} , la soluzione dell'Eq. (3.11) non può essere ottenuta analiticamente. Questa soluzione è denominata *stimatore LS non lineare* e per ottenerlo numericamente devono essere utilizzati metodi di discesa iterativa. Il più noto è il metodo di Gauss-Newton, la cui idea è di linearizzare il modello dell'Eq. (3.2) usando derivate parziali e approssimazione di Taylor del primo ordine e poi calcolare, sfruttando LS lineari nell'Eq. (3.11), una nuova soluzione approssimata. Ad esempio, la prima iterazione del metodo di Gauss Newton fornisce la stima

$$\hat{\mathbf{p}}_1 = \hat{\mathbf{p}}_0 + (\mathbf{S}^T \mathbf{B}^{-1} \mathbf{S})^{-1} \mathbf{S}^T (\mathbf{z} - \mathbf{G}(\hat{\mathbf{p}}_0)) \quad (\text{Eq. 3.12})$$

dove $\hat{\mathbf{p}}_0$ è l'ipotesi iniziale e \mathbf{S} , la matrice di sensibilità, è la matrice $N \times M$ data da

$$S_{ij} = \left. \frac{\partial g(t_i; \mathbf{p})}{\partial p_j} \right|_{\mathbf{p}=\hat{\mathbf{p}}_0} \quad (\text{Eq. 3.13})$$

La generica k -esima iterazione si ottiene sostituendo 1 e 0 nelle equazioni (3.12) e (3.13) con k e $k-1$, rispettivamente. Un punto delicato per l'utente dei metodi iterativi è la definizione dell'ipotesi iniziale $\hat{\mathbf{p}}_0$, perché una scelta sbagliata può far convergere il metodo a un minimo locale della funzione costo piuttosto che al suo minimo globale.

In letteratura, la terminologia “pesi assoluti” è spesso usata quando \mathbf{B} coincide con $\sum \mathbf{v}$ dell'Eq. (5.5) e “pesi relativi” quando $\sum \mathbf{v}$ è noto indipendentemente dal fattore di scala σ^2 . In quest'ultimo caso si può fornire una stima di σ^2 a posteriori dividendo il valore della funzione di costo $J(\hat{\mathbf{p}}_{LS})$ per i gradi di libertà del modello $N-M$ (con N è il numero di campioni e M è il numero dei parametri del modello):

$$\sigma^2 = \frac{J_{LS}(\hat{\mathbf{p}}_{LS})}{N-M} \quad (\text{Eq. 3.14})$$

Analisi dei residui

Dopo aver ottenuto una stima dei parametri, sono noti anche le equazioni e i valori numerici dei parametri del modello, ma prima di valutare se il modello è attendibile, è necessario valutarne la qualità. Per tale scopo, il primo passo è l'analisi del vettore dei residui

$$\mathbf{r} = \mathbf{z} - \mathbf{G}(\hat{\mathbf{p}}) \quad (\text{Eq. 3.15})$$

che, indipendentemente da come si ottiene $\hat{\mathbf{p}}$, fornisce una misura della bontà dell'adattamento, poiché rappresenta la distanza tra i dati, \mathbf{z} , e la previsione del modello, $\mathbf{G}(\hat{\mathbf{p}})$, raggiunto dopo la conclusione del processo di stima dei parametri. In vista dell'Eq. (3.4), il vettore \mathbf{r} può essere pensato come una sorta di stima del vettore \mathbf{v} . È quindi logico pretendere che un buon modello porti a residui compatibili con la descrizione statistica, nota o attesa, di \mathbf{v} . Ad esempio, supponendo che gli errori non siano correlati e la loro varianza sia nota, ciascun residuo dovrebbe essere diviso per la corrispondente deviazione standard del rumore e i residui ponderati risultanti dovrebbero risiedere principalmente nella regione delimitata da -1 e 1.

Precisione delle stime

Un altro criterio importante per valutare la bontà dell'identificazione del modello è la precisione dei parametri stimati. Infatti, i dati $\{z_k\}$ sono affetti da errore e quindi sono incerti. Di conseguenza, anche il vettore del parametro stimato è incerto. Per valutare la precisione delle stime, si definisce l'errore di stima come:

$$\tilde{\mathbf{p}} = \mathbf{p} - \hat{\mathbf{p}} \quad (\text{Eq. 3.16})$$

dove \mathbf{p} è il valore vero, anche se incognito, dei parametri del modello. Assumendo che lo stimatore sia imparziale, cioè che $E[\tilde{\mathbf{p}}]$ sia il vettore nullo, l'incertezza che influenza le stime può essere misurata utilizzando la matrice di covarianza di $\tilde{\mathbf{p}}$

$$\sum_{\tilde{\mathbf{p}}} E[\tilde{\mathbf{p}}\tilde{\mathbf{p}}^T] \quad (\text{Eq. 3.17})$$

In particolare, la radice quadrata degli elementi diagonali di questa matrice di covarianza restituisce le deviazioni standard dell'errore di stima che interessano gli elementi di $\hat{\mathbf{p}}$. Nel caso lineare, si ottiene facilmente un'espressione in forma chiusa per l'Eq. (5.13)

$$\sum_{\tilde{\mathbf{p}}} (\mathbf{G}^T \Sigma_v^{-1} \mathbf{G})^{-1} \quad (\text{Eq. 3.18})$$

mentre, nel caso non lineare, viene spesso invocata la seguente approssimazione

$$\sum_{\tilde{\mathbf{p}}} (\mathbf{S}^T \Sigma_v^{-1} \mathbf{S})^{-1} \quad (\text{Eq. 3.19})$$

dove \mathbf{S} è la matrice $N \times M$ del sistema linearizzato come nell'Eq. (3.13) calcolato per $\mathbf{p} = \hat{\mathbf{p}}$.

[12]

3.3 Analisi statistica della varianza (ANOVA)

Dopo aver identificato il modello si confrontano i dati relativi alle diverse modalità sperimentali e alle due tipologie di soggetti (sani e T1DM) con l'obiettivo di indagare se, considerando contemporaneamente i tre fattori di variabilità (presenza o meno della patologia, modalità sperimentale e tipo di fit, su entrambi i traccianti o su uno solo di essi), emergono differenze statisticamente significative per i parametri. Per fare questo viene implementata l'analisi della varianza tramite la function di MATLAB® *anovan*. L'analisi della varianza (ANOVA, ANalysis Of VAriance) è una tecnica statistica che permette di determinare se vi siano differenze statisticamente significative tra le medie di due o più popolazioni e per fare questo si prendono in considerazione le rispettive varianze. Il principio alla base è quello di stabilire se due o più medie campionarie possono derivare da popolazioni che hanno la stessa media parametrica o più brevemente se si può concludere che i dati analizzati provengano dalla stessa popolazione. In particolare, il toolbox di Matlab "Statistics and Machine Learning Toolbox™" permette di eseguire l'analisi della varianza ad una via, a due vie e a N-vie, per lo scopo di questa tesi è stata implementata un'analisi a tre vie, così da poter testare gli effetti di tre fattori sulla media del vettore y . La funzione in questione è " $p = \text{anovan}(y, \{g1, g2, g3\})$ ", dove il vettore y è il vettore di risposta e $g1$, $g2$ e $g3$ sono i gruppi di variabili, detti anche fattori. Nell'output della funzione, ossia la tabella ANOVA, sono riportati i p-values, uno per termine ($X1$, $X2$ e $X3$ corrispondono rispettivamente ai fattori $g1$, $g2$, $g3$), che permettono di determinare se le differenze tra le medie sono statisticamente significative. In particolare, se il "p-value" in questione è superiore a 0.05 (generalmente soglia utilizzata del 5% per errore di tipo 1) si assume che le risposte medie per le variabili di quel specifico fattore non sono significativamente differenti. Al contrario, se inferiore a 0.05, è sufficientemente piccolo da concludere che le risposte medie sono significativamente diverse. A seconda del protocollo sperimentale esaminato, Pasto o Esercizio fisico, e del vettore di risposta analizzati, k_{22} o *half-life*, i vettori y , $g1$, $g2$ e $g3$ assumeranno valori diversi [17].

Capitolo 4.

RISULTATI

In questo capitolo sono riportati i risultati dell'identificazione del modello descritto precedentemente.

Di seguito vengono illustrati per entrambi i protocolli analizzati, pasto ed esercizio fisico, i risultati ottenuti dalla stima parametrica, implementata in MATLAB® dalla funzione *lsqnonlin*. Si possono osservare i grafici dei fit e dei residui pesati medi, mediante i quali è possibile valutare l'adeguatezza del modello nel descrivere i dati.

Inoltre, per una visione più efficiente dei dati risulta conveniente rappresentare una versione aggregata, che permette di tener conto di tutti i soggetti per ogni protocollo, popolazione e modalità di fitting. A partire dai valori dei parametri ottenuti si definiscono il valore minimo, il 25-esimo percentile, il valore mediano, il 75-esimo percentile e il valore massimo. Sulle basi di questi valori si costruiscono gli istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) e i box-plot o “diagrammi a scatole e baffi”, che vengono usati come strumento visivo per la verifica della normalità, in quanto consentono di visualizzare il centro e la distribuzione dei dati. Quindi, verranno mostrati le tabelle contenenti i valori, sopra definiti, necessari per costruire i grafici e i diagrammi risultanti. Infine, sono riportati i risultati dell'analisi statistica.

4.1 Pasto

4.1.1 *Fit contemporaneo su D_2 e ^{13}C*

Nelle seguenti figure sono riportati, per il fit eseguito su entrambi i traccianti contemporaneamente, gli andamenti temporali medi dei dati e della predizione del modello e l'andamento temporale medio dei residui pesati; questi ultimi, come si è visto nel paragrafo 3.2.2, costituiscono una stima dell'errore di predizione. Precisamente, nelle figure 4.1a e 4.1b per i soggetti sani e nelle figure 4.2a e 4.2b per i soggetti T1DM.

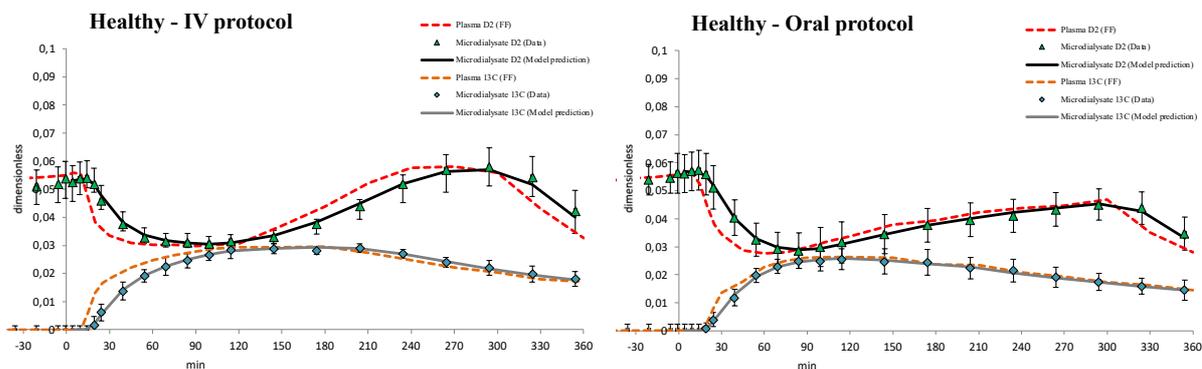


Figura 4.1a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti sani.

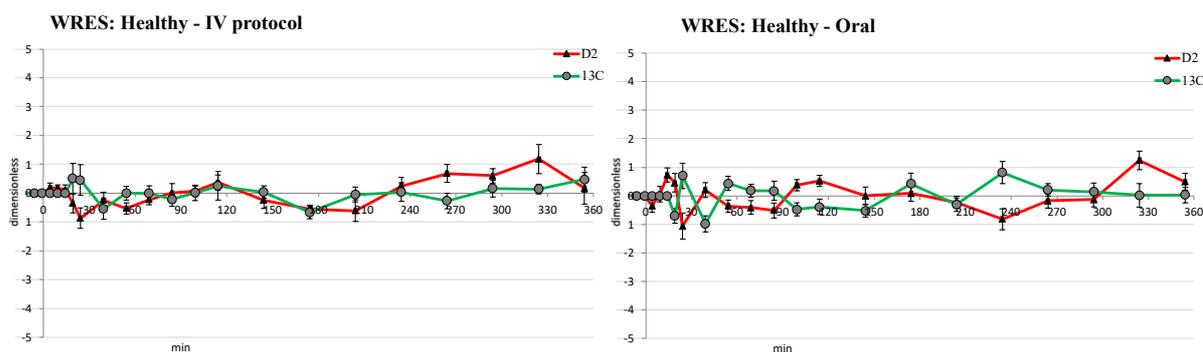


Figura 4.1 b: Andamento temporale medio dei residui pesati (D_2 in rosso e ^{13}C in verde) per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti sani.

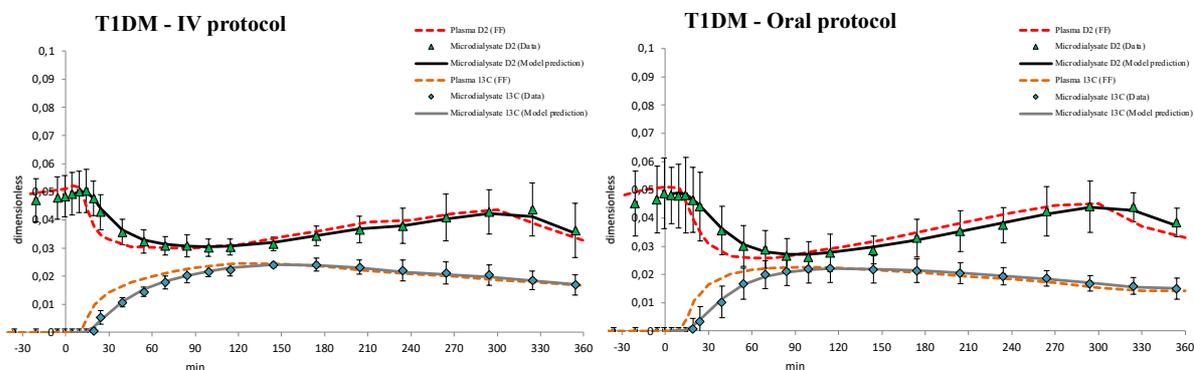


Figura 4.2 a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti T1DM.

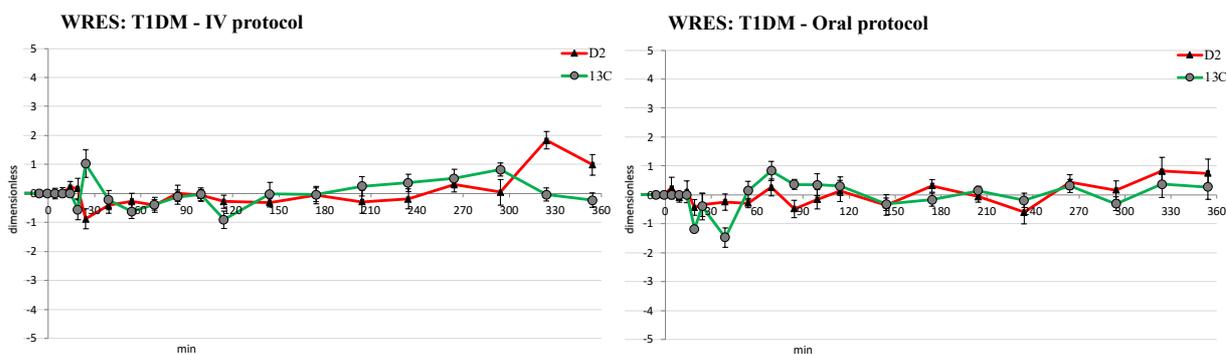


Figura 4.2 b: Andamento temporale medio dei residui pesati (D_2 in rosso e ^{13}C in verde) per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti T1DM.

Il fit medio è soddisfacente, tuttavia il modello non riesce a riprodurre fedelmente l'andamento medio dei dati nella parte finale dell'esperimento nel caso della somministrazione endovenosa dei traccianti per i soggetti diabetici. Si vedano i residui medi con barre di errore che non attraversano lo zero.

I valori medi del parametro stimato, con le relative precisioni, sono riassunti nella seguente tabella, si può osservare che il parametro è stimato con precisioni molto buone: i CV medi assumono valori attorno al 10%. Inoltre, si può notare una precisione migliore nel caso della somministrazione orale dei traccianti.

	HEALTHY-IV		HEALTHY-ORAL		T1DM-IV		T1DM-ORAL	
	k_{22} [min^{-1}]	CV [%]						
MEAN	0,069	10	0,065	8	0,082	12	0,058	10
SD	0,031	4	0,015	3	0,057	6	0,029	5
SE	0,010	1	0,005	1	0,018	2	0,010	2

Tabella 4.1a: valori medi e relative precisioni delle stime dei parametri per il fit contemporaneo su entrambi i traccianti.

Di seguito le tabelle contenenti i valori necessari per costruire i box-plots e gli istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE), sia per il parametro stimato k_{22} che per l'*half-life*.

[min^{-1}]	Healthy		T1DM	
	IV-Meal	Oral-Meal	IV-Meal	Oral-Meal
Min	0,036	0,046	0,038	0,033
25th per - Min	0,012	0,007	0,008	0,012
Median - 25th per	0,013	0,010	0,010	0,004
75th per - Median	0,010	0,011	0,029	0,017
Max - 75th per	0,067	0,013	0,103	0,062
MEAN	0,069	0,065	0,082	0,058
SD	0,029	0,015	0,057	0,029

Tabella 4.1b: risultati ottenuti a partire dai k_{22} con fit contemporaneo su entrambi i traccianti.

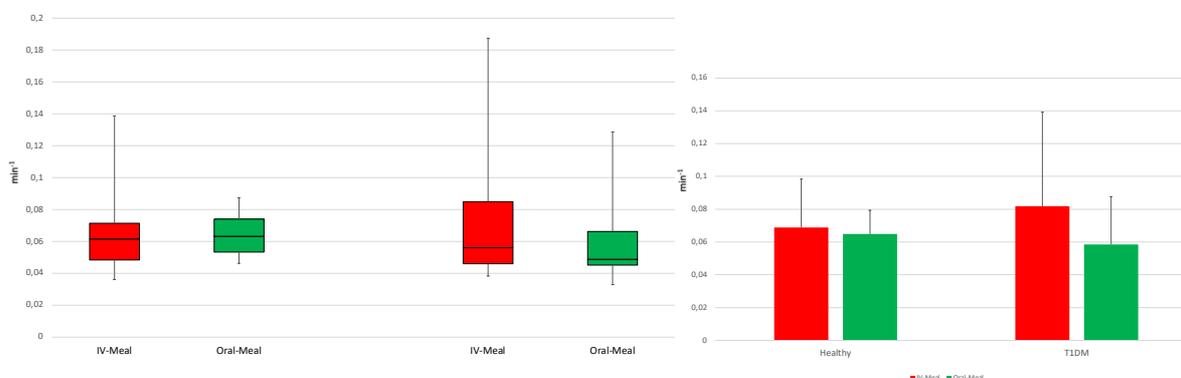


Figura 4.3a: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per il parametro k_{22} .

	Healthy		T1DM	
[min]	IV-Meal	Oral-Meal	IV-Meal	Oral-Meal
Min	5,0	7,9	3,7	5,4
25th per - Min	4,7	1,5	4,5	5,1
Median - 25th per	1,7	1,5	4,1	3,7
75th per - Median	3,0	2,1	2,8	1,2
Max - 75th per	4,9	1,9	3,0	5,8
MEAN	11,6	11,2	11,5	13,8
SD	4,0	2,5	5,2	4,8

Tabella 4.1c: risultati ottenuti a partire dagli half-life con fit contemporaneo su entrambi i traccianti.

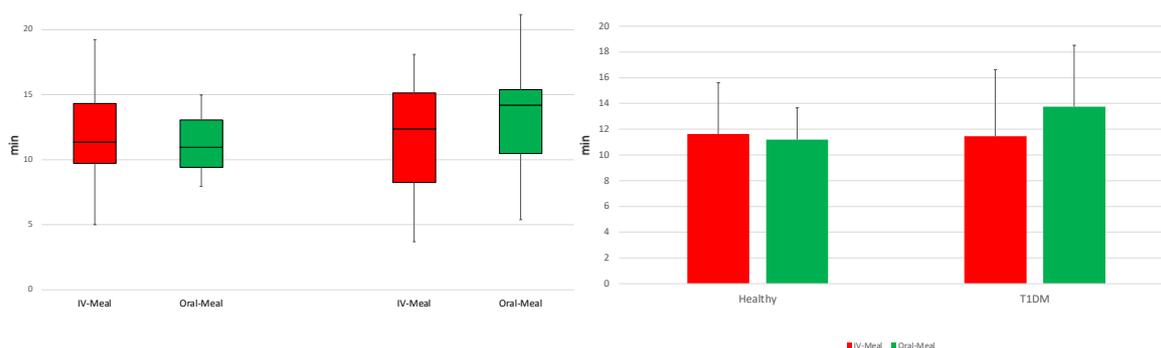


Figura 4.3b: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per l'half-life.

4.1.2 Fit su D_2

Nelle seguenti figure sono riportati, per il campionamento eseguito sul solo tracciante D_2 , gli andamenti temporali medi dei dati e della predizione del modello e l'andamento temporale medio dei residui pesati. Precisamente, nelle figure 4.4a e 4.4b per i soggetti sani e nelle figure 4.5a e 4.5b per i soggetti T1DM.

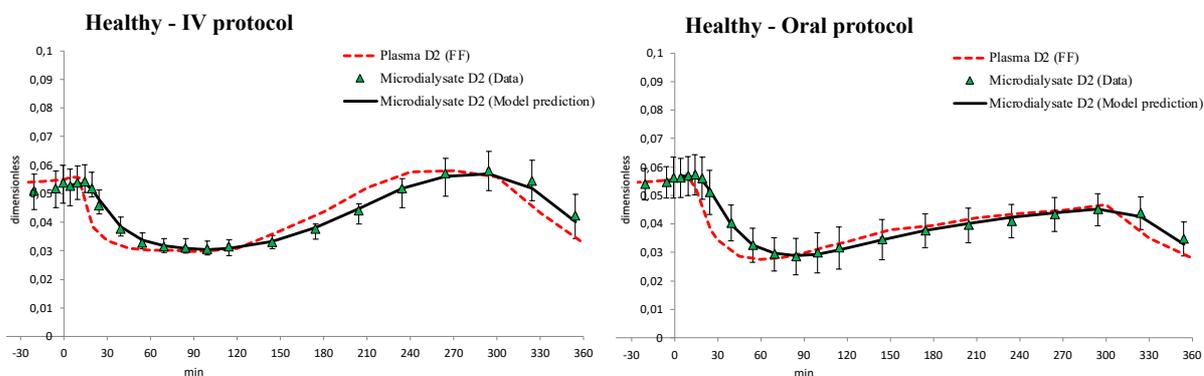


Figura 4.4a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti sani.

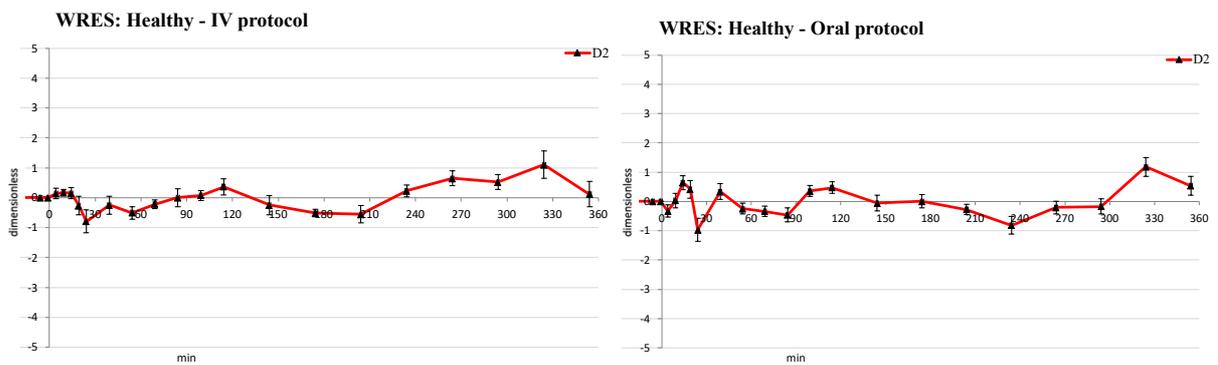


Figura 4.4b: Andamento temporale medio dei residui pesati per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti sani.

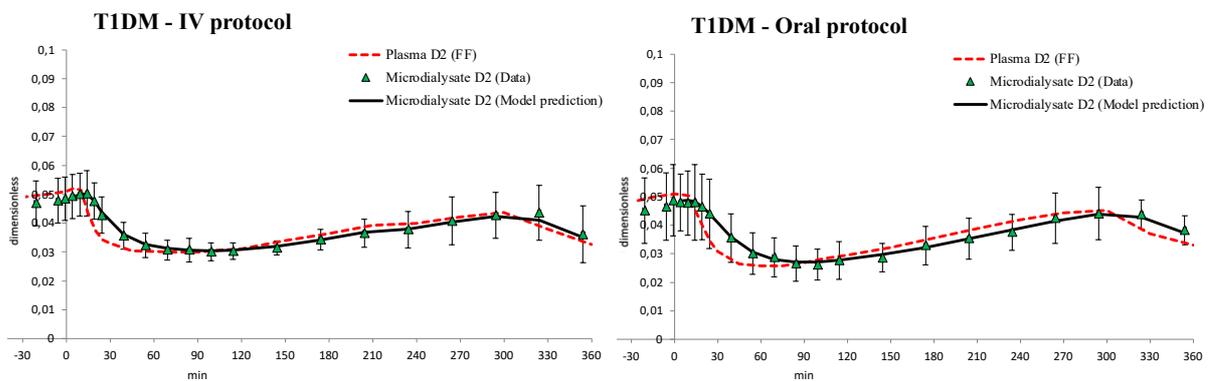


Figura 4.5a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti T1DM.

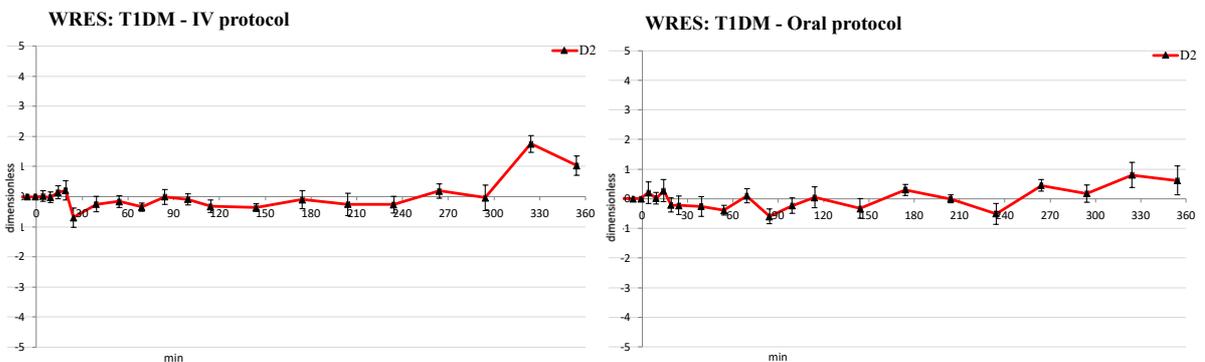


Figura 4.5b: Andamento temporale medio dei residui pesati per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti T1DM.

Il fit e i residui medi sono soddisfacenti. Tuttavia, il modello non riesce a riprodurre fedelmente l'andamento medio dei dati nella parte finale dell'esperimento, si vedano i residui medi con barre di errore che non attraversano lo zero.

I valori medi del parametro stimato, con le relative precisioni, sono riassunti nella seguente tabella e si può osservare che il parametro è stimato con precisioni buone, si può notare un lieve peggioramento della precisione per i soggetti diabetici.

	HEALTHY-IV		HEALTHY-ORAL		T1DM-IV		T1DM-ORAL	
	k_{22} [min^{-1}]	CV [%]						
MEAN	0,066	13	0,066	12	0,093	23	0,058	17
SD	0,024	5	0,017	5	0,069	18	0,045	11
SE	0,007	2	0,005	2	0,022	6	0,015	4

Tabella 4.2a: valori medi e relative precisioni delle stime dei parametri per il fit contemporaneo su entrambi i traccianti per il fit sul solo D_2 .

Di seguito le tabelle contenenti i valori necessari per costruire i box-plots e gli istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE), sia per il parametro stimato k_{22} che per l'*half-life*.

[min^{-1}]	Healthy		T1DM	
	IV-Meal	Oral-Meal	IV-Meal	Oral-Meal
Min	0,037	0,049	0,035	0,024
25th per - Min	0,014	0,003	0,016	0,015
Median - 25th per	0,013	0,008	0,022	0,006
75th per - Median	0,009	0,018	0,011	0,009
Max - 75th per	0,039	0,019	0,159	0,119
MEAN	0,066	0,066	0,093	0,058
SD	0,024	0,017	0,069	0,045

Tabella 4.2b: risultati ottenuti a partire dai k_{22} con fit sul solo D_2 .

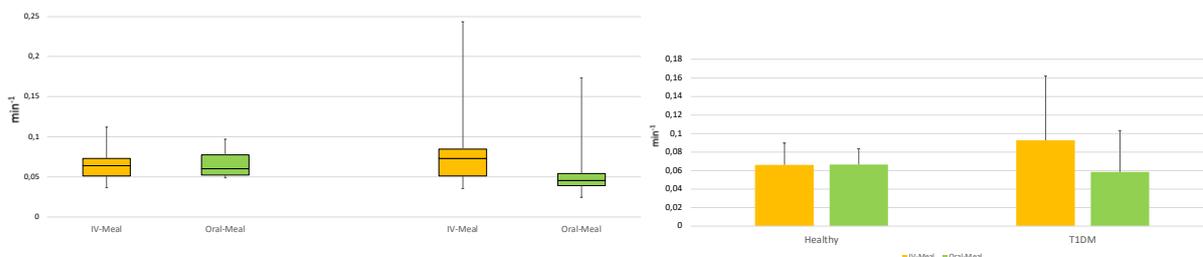


Figura 4.6a: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per il parametro k_{22} .

[min]	Healthy		T1DM	
	IV-Meal	Oral-Meal	IV-Meal	Oral-Meal
Min	6,2	7,1	2,8	4,0
25th per - Min	3,3	1,8	5,4	8,8
Median - 25th per	1,3	2,7	1,3	2,5
75th per - Median	2,8	1,6	4,0	2,4
Max - 75th per	5,3	0,9	6,1	10,7
MEAN	11,8	11,0	10,5	15,7
SD	4,2	2,6	5,3	6,8

Tabella 4.2c: risultati ottenuti a partire dagli *half-life* con fit sul solo D_2 .

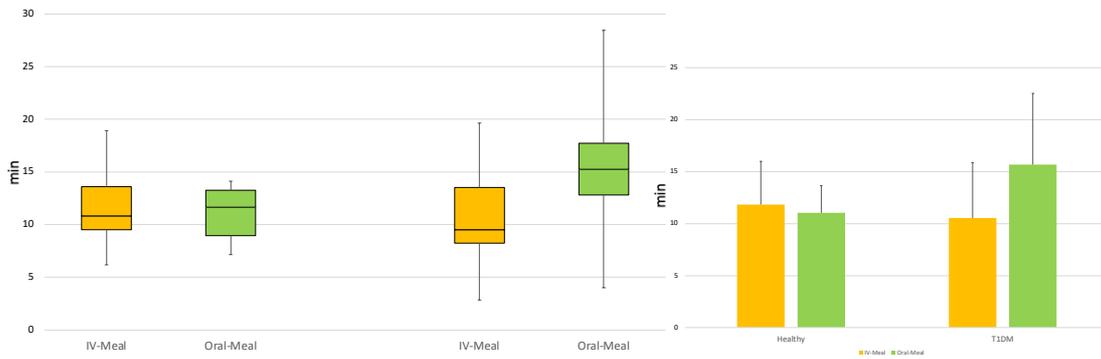


Figura 4.6b: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per l'half-life.

4.1.3 Fit su ^{13}C

Nelle seguenti figure sono riportati, per il campionamento eseguito sul solo tracciante ^{13}C , gli andamenti temporali medi dei dati e della predizione del modello e l'andamento temporale medio dei residui pesati. Precisamente, nelle figure 4.7a e 4.7b per i soggetti sani e nelle figure 4.8a e 4.8b per i soggetti T1DM.

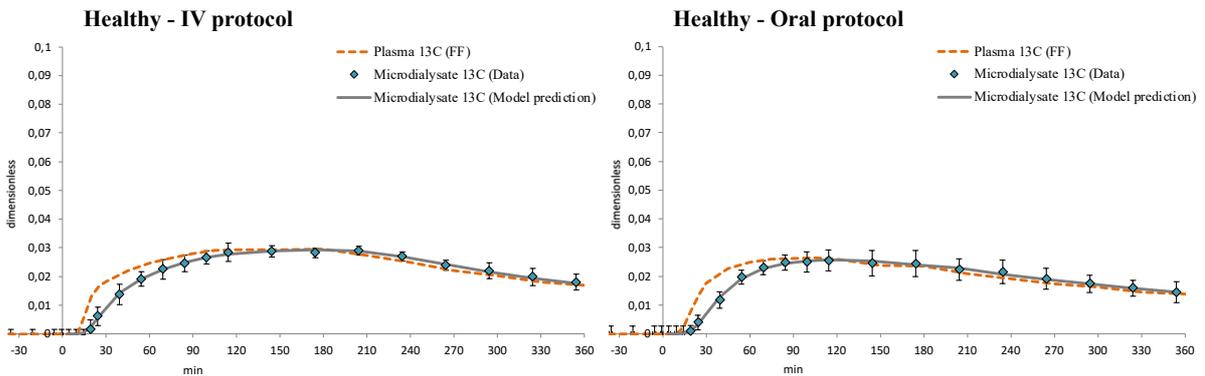


Figura 4.7a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti sani.

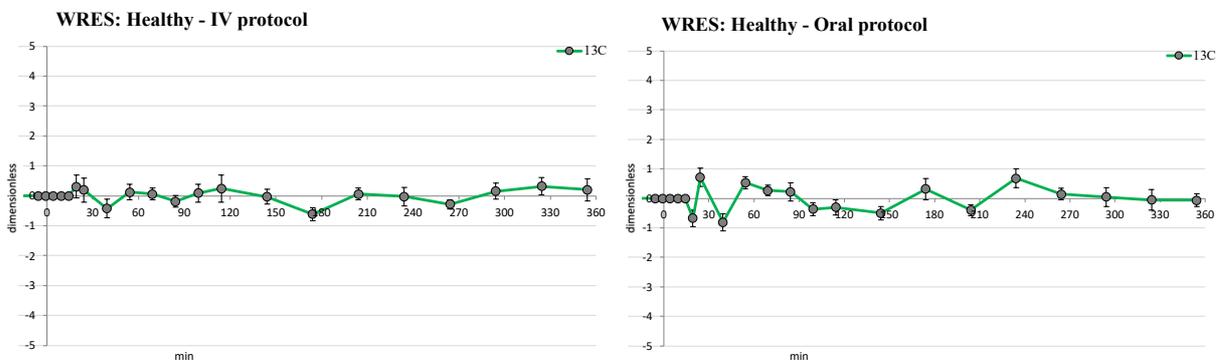


Figura 4.7b: Andamento temporale medio dei residui pesati per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti sani.

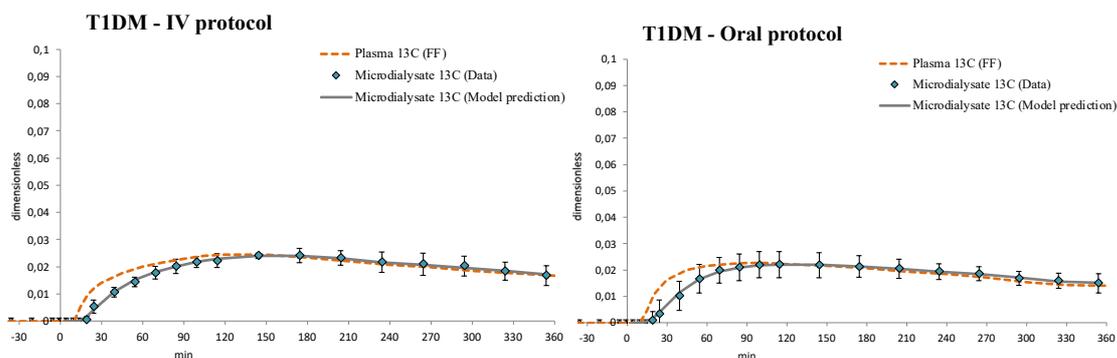


Figura 4.8a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti T1DM.

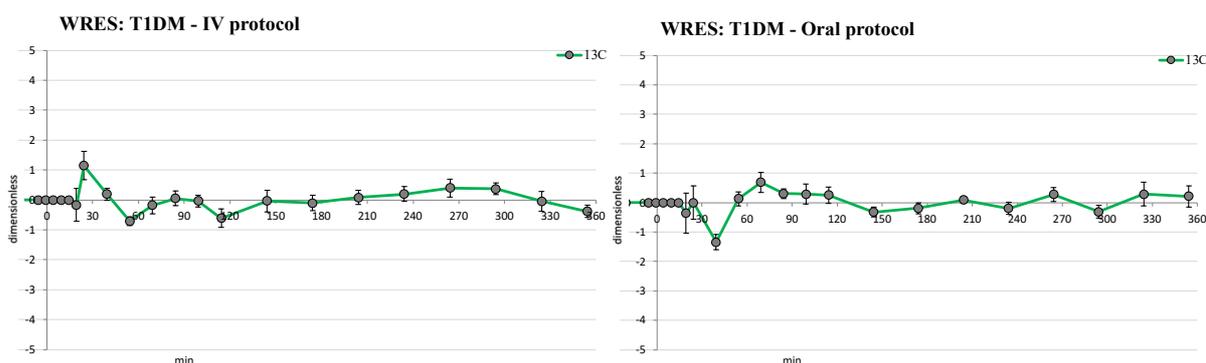


Figura 4.8b: Andamento temporale medio dei residui pesati per la somministrazione endovenosa e orale nei soggetti T1DM.

Il fit medio è soddisfacente e i residui sembrano mostrare sequenze piuttosto scorrelate di campioni.

I valori medi del parametro stimato, con le relative precisioni, sono riassunti nella seguente tabella e si può osservare che il parametro è stimato con precisioni buone, si può notare una precisione migliore per il caso della somministrazione orale dei traccianti, sia nei soggetti sani che diabetici.

	HEALTHY-IV		HEALTHY-ORAL		T1DM-IV		T1DM-ORAL	
	k_{22} [min^{-1}]	CV [%]	k_{22} [min^{-1}]	CV [%]	$k_{12}+k_{02}$ [min^{-1}]	CV [%]	k_{22} [min^{-1}]	CV [%]
MEAN	0,085	19	0,064	14	0,071	18	0,056	12
SD	0,069	11	0,015	4	0,038	10	0,020	6
SE	0,022	3	0,005	1	0,012	3	0,007	2

Tabella 4.3a: valori medi e relative precisioni delle stime dei parametri per il fit contemporaneo per il fit sul solo ^{13}C .

Di seguito le tabelle contenenti i valori necessari per costruire i box-plots e gli istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE), sia per il parametro stimato k_{22} che per l'*half-life*.

[min ⁻¹]	Healthy		T1DM	
	IV-Meal	Oral-Meal	IV-Meal	Oral-Meal
Min	0,034	0,040	0,037	0,033
25th per - Min	0,006	0,014	0,006	0,010
Median - 25th per	0,027	0,010	0,019	0,005
75th per - Median	0,013	0,007	0,024	0,019
Max - 75th per	0,197	0,017	0,069	0,029
MEAN	0,085	0,064	0,071	0,056
SD	0,069	0,015	0,038	0,020

Tabella 4.3b: risultati ottenuti a partire dai k_{22} con fit sul solo ^{13}C .

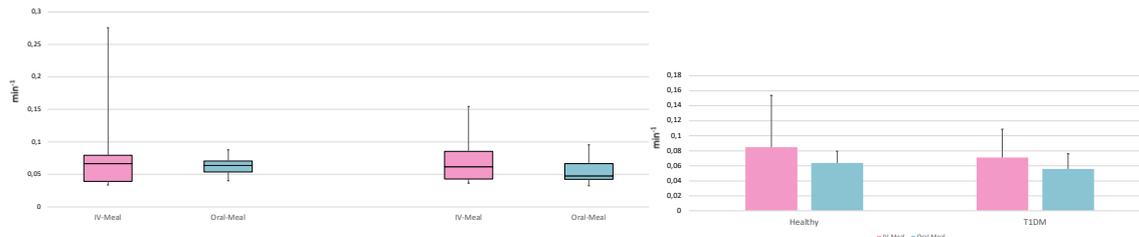


Figura 4.9a: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per il parametro k_{22} .

[min]	Healthy		T1DM	
	IV-Meal	Oral-Meal	IV-Meal	Oral-Meal
Min	2,5	7,9	4,5	7,3
25th per - Min	6,2	1,9	3,7	3,1
Median - 25th per	1,7	1,0	3,4	4,1
75th per - Median	7,2	2,1	4,6	1,8
Max - 75th per	2,8	4,4	2,7	4,9
MEAN	11,9	11,5	12,0	13,8
SD	5,7	3,0	5,1	4,6

Tabella 4.3c: risultati ottenuti a partire dagli half-life con fit sul solo ^{13}C .

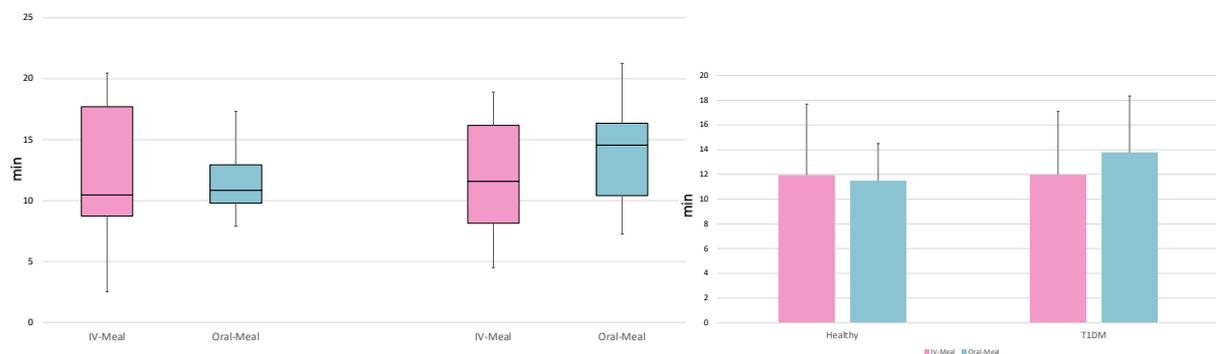


Figura 4.9b: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per l'half-life.

4.1.4 Confronti tra i parametri nelle diverse procedure di fit

Nei seguenti istogrammi si possono osservare i valori assunti dal parametro stimato k_{22} raggruppati per le diverse categorie di soggetti, sani e T1DM, per le diverse modalità di somministrazione dei traccianti, endovenosa o orale, e per le diverse procedure di fitting, fit sul solo $6,6\text{-}^2\text{H}_2$, $1\text{-}^{13}\text{C}$ o entrambi.

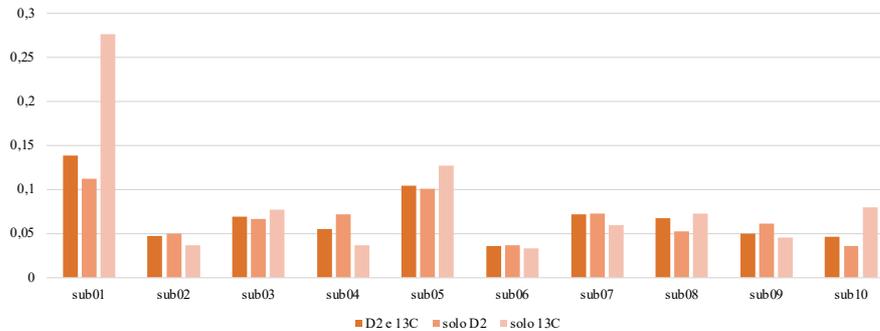


Grafico 3.1: Istogramma dei valori assunti dal parametro stimato k_{22} [min^{-1}] nel caso dell'iniezione endovenosa dei traccianti per i soggetti sani per ciascuna tipologia di fit.

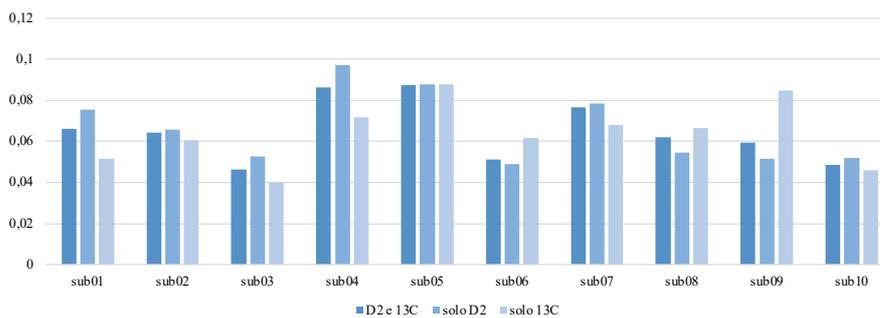


Grafico 3.2: Istogramma dei valori assunti dal parametro stimato k_{22} [min^{-1}] nel caso della somministrazione orale dei traccianti per i soggetti sani per ciascuna tipologia di fit.

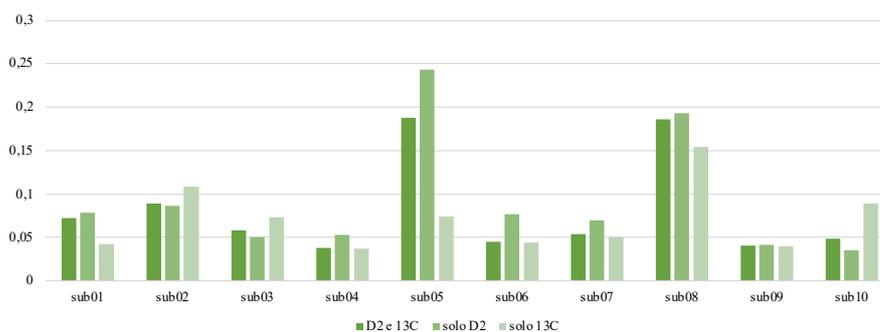


Grafico 3.3: Istogramma dei valori assunti dal parametro stimato k_{22} [min^{-1}] nel caso dell'iniezione endovenosa dei traccianti per i soggetti T1DM per ciascuna tipologia di fit.

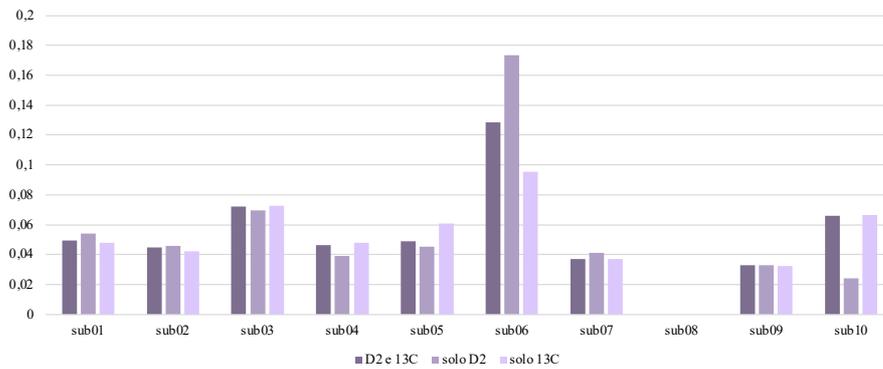


Grafico 3.4: Istogramma dei valori assunti dal parametro stimato k_{22} [min⁻¹] nel caso della somministrazione orale dei traccianti per i soggetti T1DM per ciascuna tipologia di fit.

A partire dai risultati ottenuti è stato calcolato anche l'*half-life*, come sopra si possono osservare i confronti soggetto per soggetto tra i valori assunti dal parametro derivato a seconda della procedura di fitting applicata.

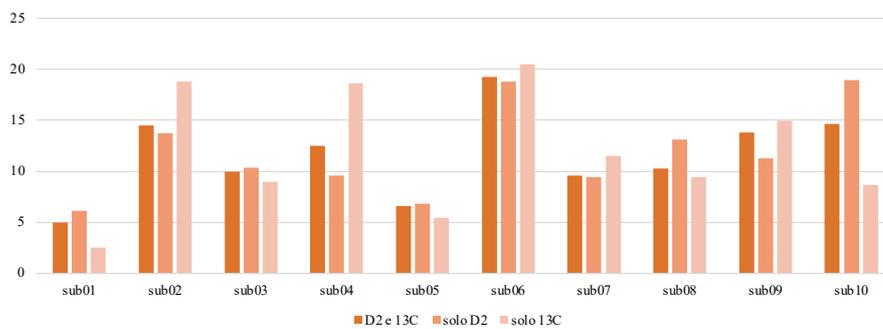


Grafico 3.5: Istogramma dei valori assunti dell'*half-life* [min] nel caso dell'iniezione endovenosa dei traccianti per i soggetti sani per ciascuna tipologia di fit.

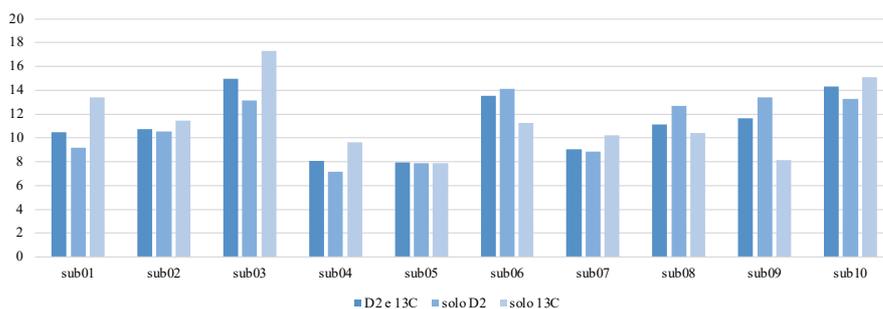


Grafico 3.6: Istogramma dei valori assunti dall'*half-life* [min] nel caso della somministrazione orale dei traccianti per i soggetti sani per ciascuna tipologia di fit.

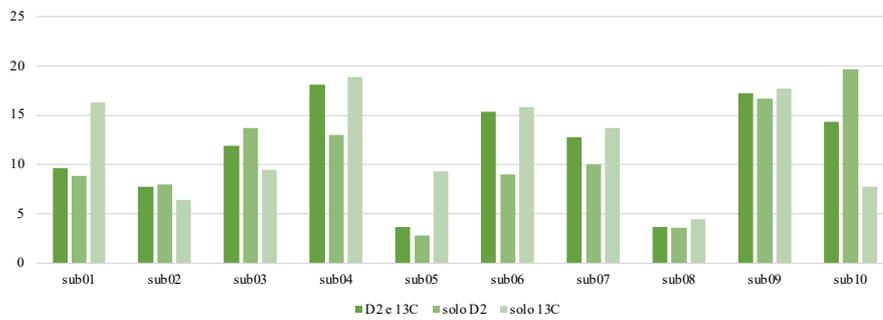


Grafico 3.7: Istogramma dei valori assunti dall'half-life [min] nel caso dell'iniezione endovenosa dei traccianti per i soggetti T1DM per ciascuna tipologia di fit.

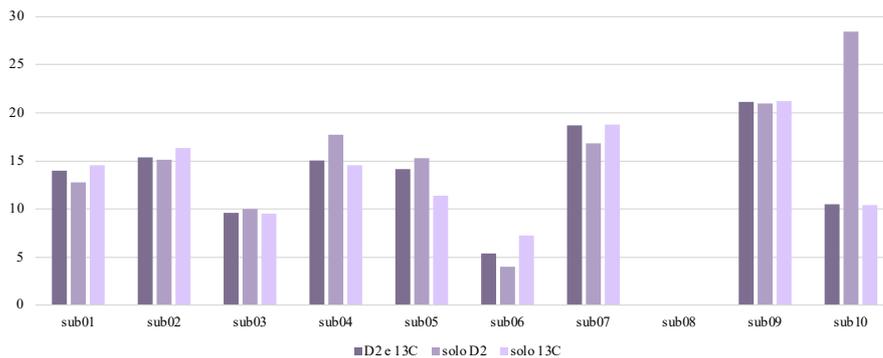


Grafico 3.8: Istogramma dei valori assunti dall'half-life [min] nel caso della somministrazione orale dei traccianti per i soggetti T1DM per ciascuna tipologia di fit.

4.1.5 Risultati dell'analisi statistica della varianza (ANOVA)

Come spiegato nel paragrafo 3.3, per il protocollo Pasto:

- il vettore g_1 ha due livelli, 1 e 2, che si riferiscono rispettivamente a soggetti sani e T1DM;
- il vettore g_2 si riferisce alla modalità di somministrazione dei traccianti, 'iv' o 'oral';
- Il vettore g_3 , invece, definisce se il fit è stato eseguito 'solo su D_2 ', 'solo su ^{13}C ' o se contemporaneamente su entrambi i traccianti, ossia su ' D_2 e ^{13}C '.

Poi, a seconda del parametro analizzato, il vettore y contiene tutti i k_{22} o tutti gli half-life. È importante osservare che i quattro vettori devono avere la stessa lunghezza e che gli elementi di ciascun vettore aventi lo stesso indice devono essere associati tra loro. Per esempio:

$$y(1) = 0.138766596;$$

$$g_1(1) = 1;$$

$$g_2(1) = 'iv';$$

$$g_3(1) = 'D_2 \text{ e } ^{13}C';$$

significa che $k_{22}=0.138766596 \text{ min}^{-1}$ è un parametro relativo ad un soggetto sano, la somministrazione dei traccianti è avvenuta per via endovenosa e il fit è stato eseguito contemporaneamente su D_2 e ^{13}C .

I risultati ottenuti per l'analisi statistica dei parametri stimati k_{22} e degli *half-life* sono mostrati nelle seguenti figure, che corrispondono agli output della funzione anovan.

Analysis of Variance					
Source	Sum Sq.	d.f.	Mean Sq.	F	Prob>F
X1	0.00002	1	0.00002	0.01	0.9139
X2	0.00761	1	0.00761	4.57	0.0348
X3	0.00014	2	0.00007	0.04	0.9586
Error	0.1866	112	0.00167		
Total	0.19439	116			

Constrained (Type III) sums of squares.

Figura 5.1: Output della funzione anovan, analisi della varianza del parametro k_{22}

Per quanto riguarda la stima del parametro k_{22} , l'analisi della varianza ha evidenziato differenze statisticamente significative tra la modalità di somministrazione endovenosa ed orale, essendo il p-value riferito al fattore X2 inferiore a 0.05.

Al contrario non emergono differenze statisticamente rilevanti tra soggetti normali e diabetici e nemmeno considerando le diverse modalità di fit.

Analysis of Variance					
Source	Sum Sq.	d.f.	Mean Sq.	F	Prob>F
X1	49.28	1	49.2818	2.26	0.1355
X2	42.91	1	42.912	1.97	0.1634
X3	1.89	2	0.9466	0.04	0.9575
Error	2441.86	112	21.8023		
Total	2533.59	116			

Constrained (Type III) sums of squares.

Figura 5.2: Output della funzione anovan, analisi della varianza del parametro *half-life*

Nel caso dell'*half-life* l'analisi della varianza non ha evidenziato differenze statisticamente rilevanti tra soggetti sani e diabetici, né per gli altri fattori di variabilità.

4.2 Esercizio fisico

4.2.1 Fit contemporaneo su D_2 e ^{13}C

Nelle seguenti figure sono riportati, per il campionamento eseguito su entrambi i traccianti contemporaneamente, gli andamenti temporali medi dei dati e della predizione del modello e l'andamento temporale medio dei residui pesati; questi ultimi, come si è visto nel paragrafo 3.2.2, costituiscono una stima dell'errore di predizione. Precisamente, nelle figure 4.10a e 4.10b per i soggetti sani e nelle figure 4.11a e 4.11b per i soggetti T1DM.

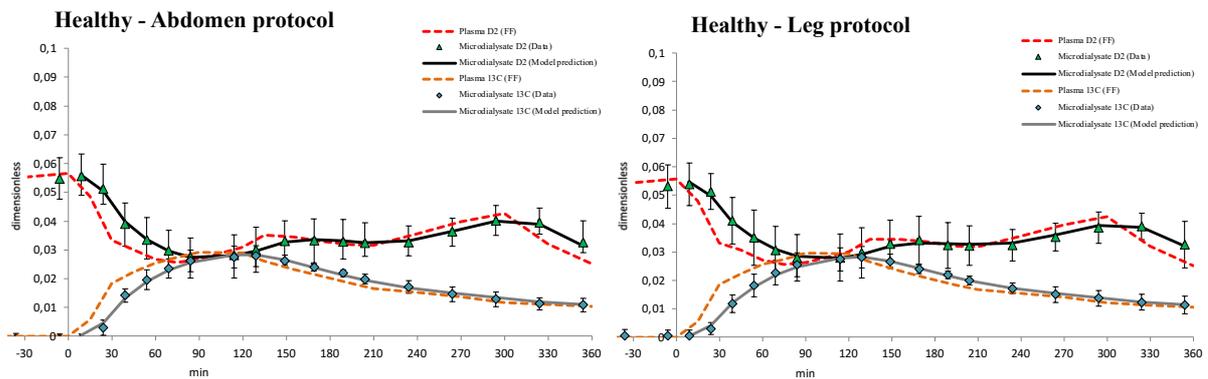


Figura 4.10a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti sani.

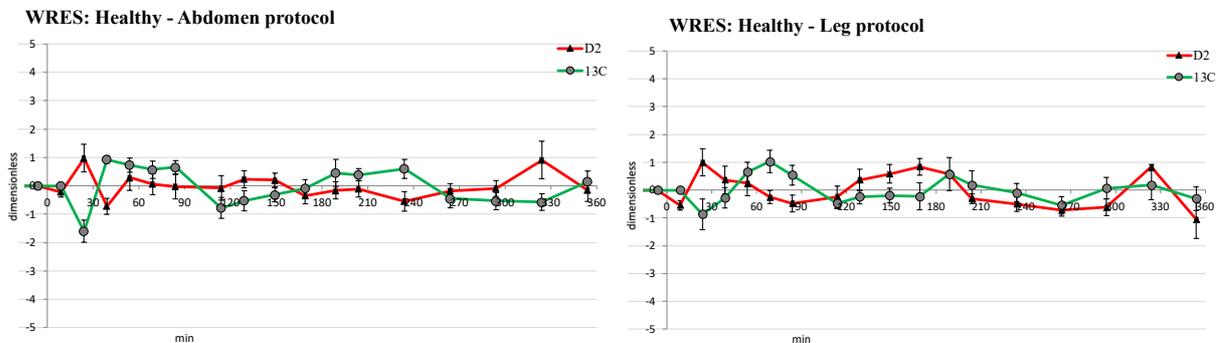


Figura 4.10b: Andamento temporale medio dei residui pesati nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti sani.

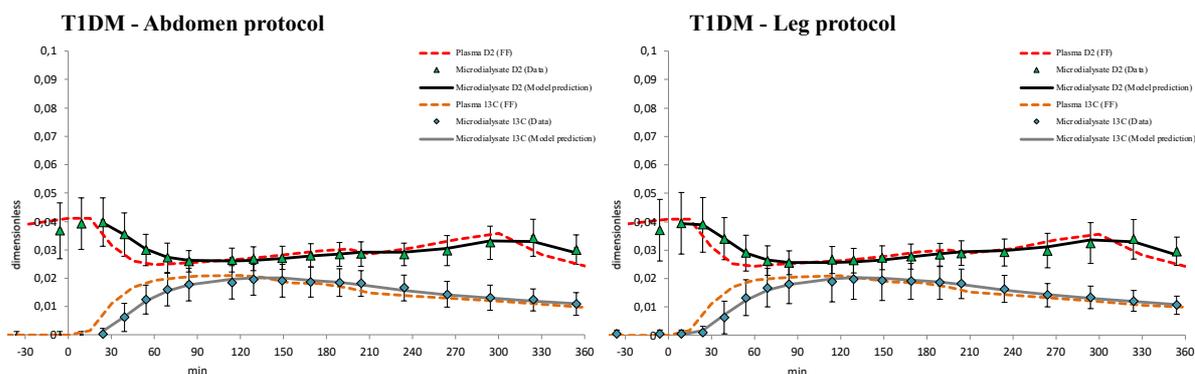


Figura 4.11a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti T1DM.

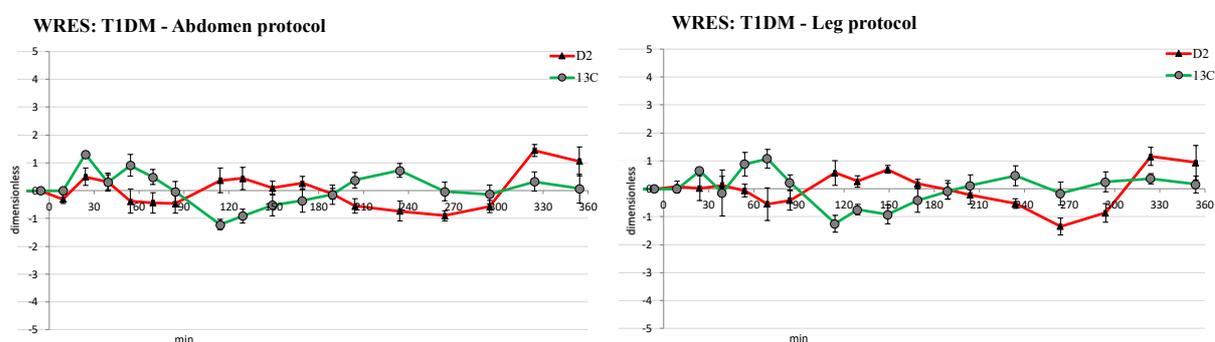


Figura 4.11b: Andamento temporale medio dei residui pesati nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti T1DM.

Il fit medio è soddisfacente ma i residui sembrano mostrare sequenze non completamente scorrelate di campioni.

I valori medi del parametro stimato, con le relative precisioni, sono riassunti nella seguente tabella e si può osservare che il parametro è stimato con precisioni ottime: i CV medi assumono valori inferiori al 10%.

	HEALTHY-ABDOMEN		HEALTHY-LEG		T1DM-ABDOMEN		T1DM-LEG	
	k_{22} [min^{-1}]	CV [%]						
MEAN	0,063	6	0,055	5	0,048	8	0,047	8
SD	0,019	1	0,022	1	0,023	2	0,020	4
SE	0,007	0,3	0,009	0,4	0,009	1	0,008	1

Tabella 4.4a: valori medi e relative precisioni delle stime dei parametri per il fit contemporaneo su entrambi i traccianti.

Di seguito le tabelle contenenti i valori necessari per costruire i box-plots e gli istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE), sia per il parametro stimato k_{22} che per l'*half-life*.

[min ⁻¹]	Healthy		T1DM	
	Abdomen	Leg	Abdomen	Leg
Min	0,033	0,025	0,023	0,023
25th per - Min	0,019	0,012	0,012	0,008
Median - 25th per	0,014	0,027	0,004	0,018
75th per - Median	0,011	0,003	0,022	0,010
Max - 75th per	0,010	0,011	0,021	0,014
MEAN	0,063	0,055	0,048	0,047
SD	0,019	0,022	0,023	0,020

Tabella 4.4b: risultati ottenuti a partire dai k_{22} con fit contemporaneo su entrambi i traccianti.

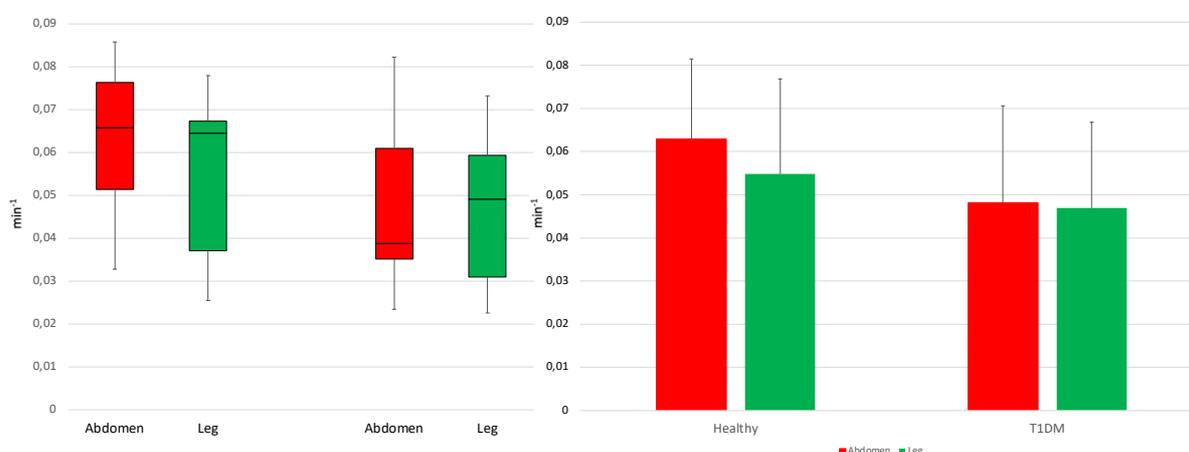


Figura 4.12a: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per il parametro k_{22} .

[min]	Healthy		T1DM	
	Abdomen	Leg	Abdomen	Leg
Min	8,1	8,9	8,4	9,5
25th per - Min	1,0	1,4	3,8	2,2
Median - 25th per	1,5	0,5	5,7	2,8
75th per - Median	2,9	10,2	1,9	8,7
Max - 75th per	7,6	6,3	9,9	7,6
MEAN	12,1	15,3	17,1	17,7
SD	4,5	8,1	7,3	8,5

Tabella 4.4c: risultati ottenuti a partire dagli *half-life* con fit contemporaneo su entrambi i traccianti.

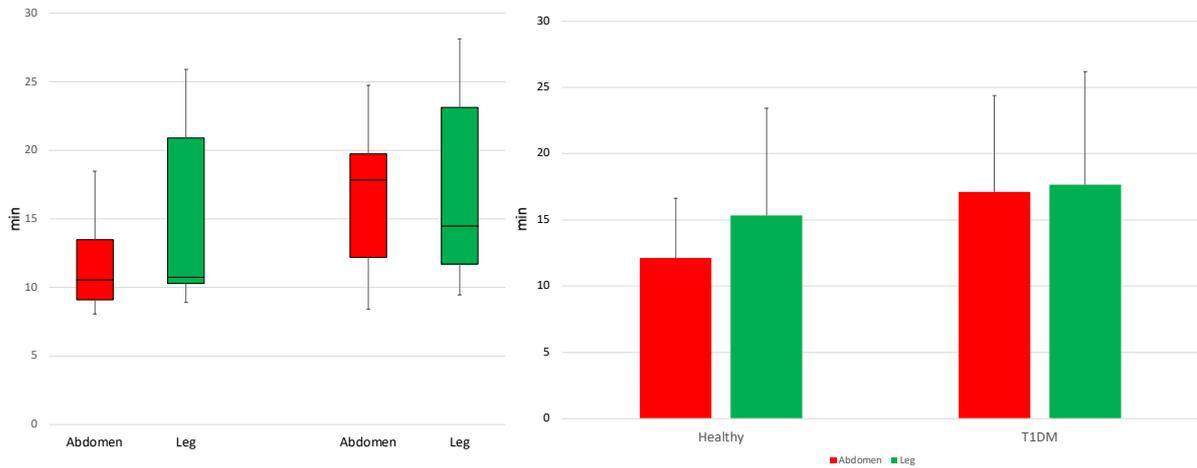


Figura 4.12b: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per l'half-life.

4.2.2 Fit su D_2

Nelle seguenti figure sono riportati, per il campionamento eseguito sul solo tracciante D_2 , gli andamenti temporali medi dei dati e della predizione del modello e l'andamento temporale medio dei residui pesati. Precisamente, nelle figure 4.13a e 4.13b per i soggetti sani e nelle figure 4.14 a e 4.14b per i soggetti T1DM.

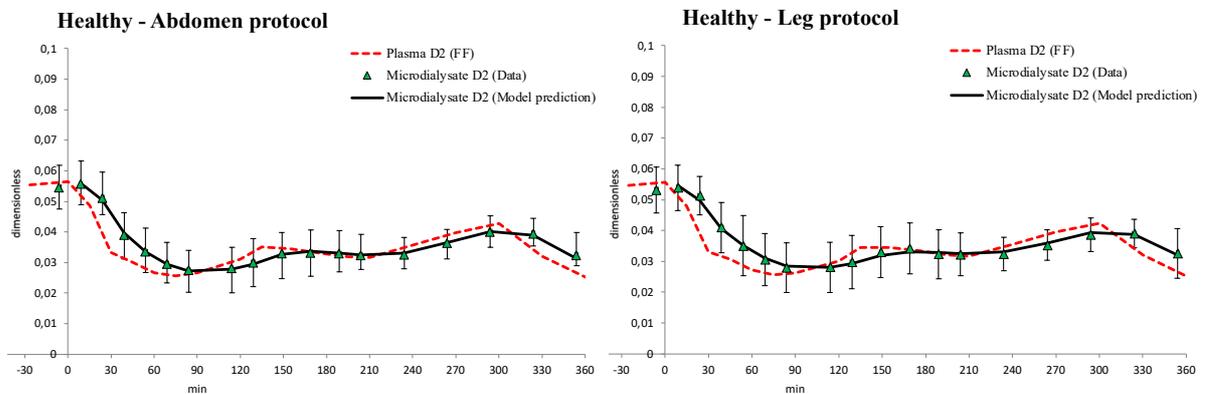


Figura 4.13a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti sani.

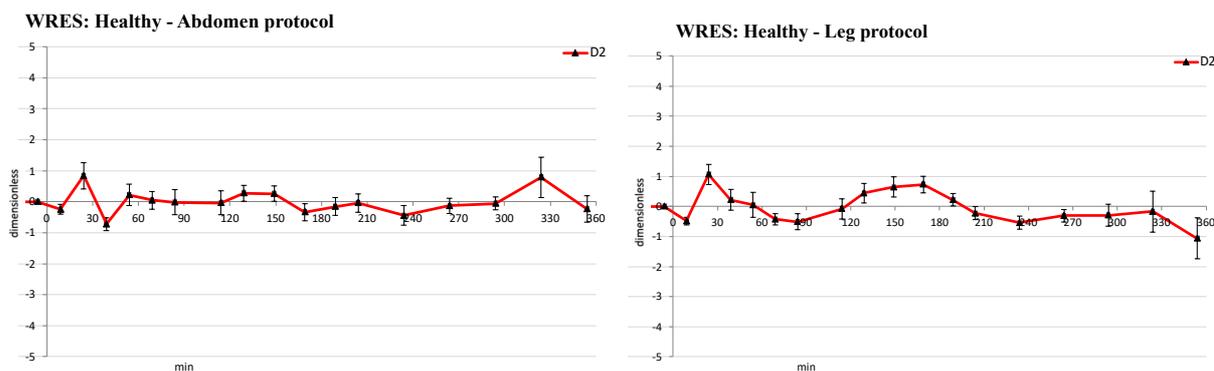


Figura 4.13b: Andamento temporale medio dei residui pesati nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti sani.

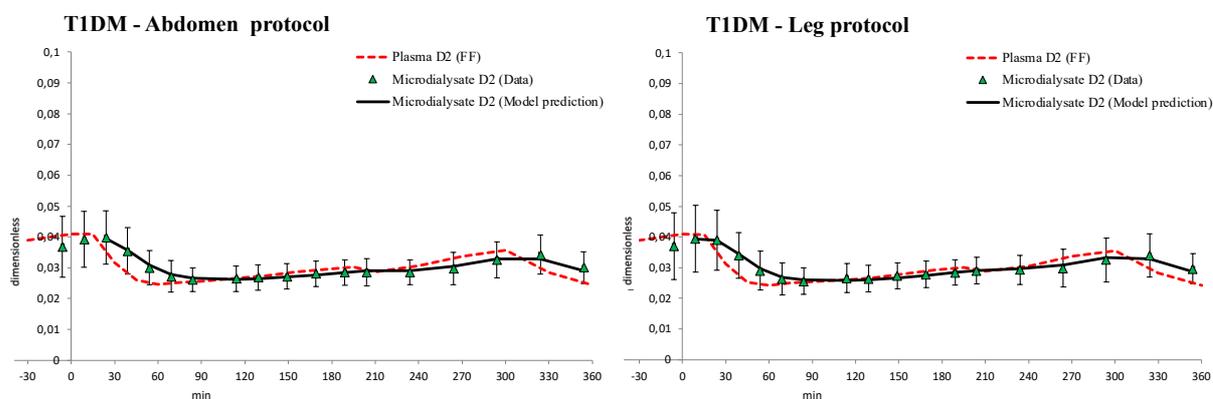


Figura 4.14a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti T1DM.

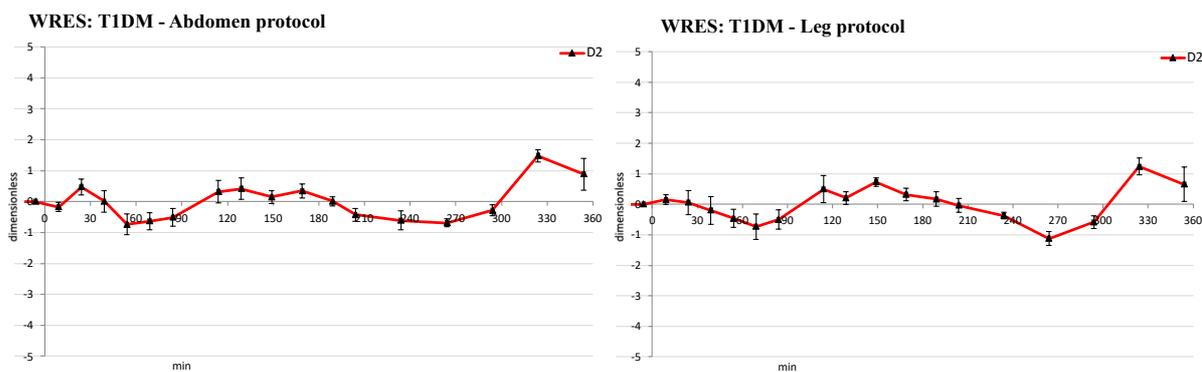


Figura 4.14b: Andamento temporale medio dei residui pesati nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti T1DM.

Il fit medio è soddisfacente ma anche in questo caso i residui sembrano mostrare sequenze non completamente scorrelate di campioni.

I valori medi del parametro stimato, con le relative precisioni, sono riassunti nella seguente tabella e si può osservare che il parametro è stimato con precisioni molto buone.

	HEALTHY-ABDOMEN		HEALTHY-LEG		T1DM-ABDOMEN		T1DM-LEG	
	k_{22} [min^{-1}]	CV [%]						
MEAN	0,063	10	0,054	13	0,041	14	0,040	13
SD	0,014	5	0,023	4	0,015	8	0,015	7
SE	0,005	2	0,009	1	0,006	3	0,006	3

Tabella 4.5a: valori medi e relative precisioni delle stime dei parametri per il fit sul solo D_2 .

Di seguito le tabelle contenenti i valori necessari per costruire i box-plots e gli istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE), sia per il parametro stimato k_{22} che per l'*half-life*.

[min^{-1}]	Healthy		T1DM	
	Abdomen	Leg	Abdomen	Leg
Min	0,043	0,023	0,023	0,019
25th per - Min	0,007	0,015	0,012	0,010
Median - 25th per	0,016	0,021	0,002	0,012
75th per - Median	0,006	0,005	0,012	0,008
Max - 75th per	0,005	0,020	0,014	0,011
MEAN	0,063	0,054	0,041	0,040
SD	0,014	0,017	0,015	0,015

Tabella 4.5b: risultati ottenuti a partire dai k_{22} con fit sul solo D_2 .

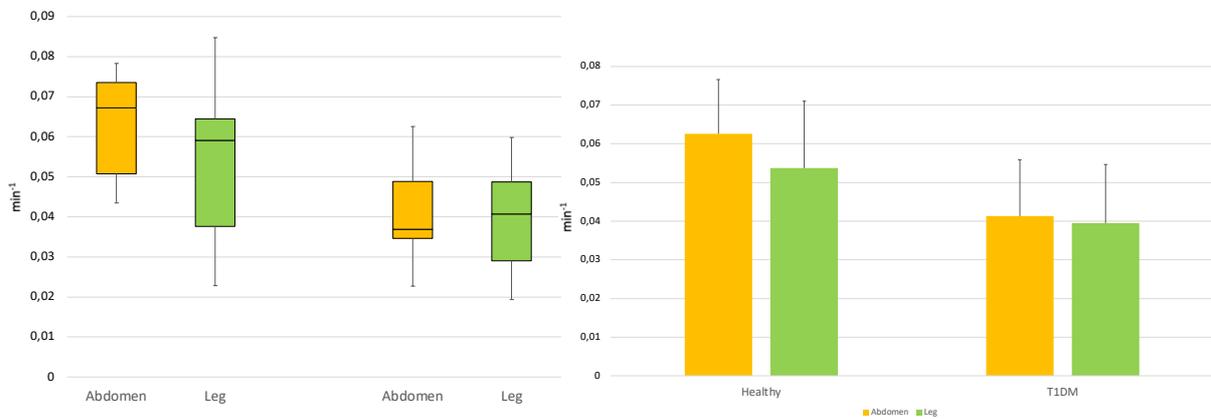


Figura 4.15a: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per il parametro k_{22} .

	Healthy		T1DM	
[min]	Abdomen	Leg	Abdomen	Leg
Min	8,8	8,2	11,1	11,6
25th per - Min	0,6	2,6	3,9	2,7
Median - 25th per	0,9	1,1	3,8	2,9
75th per - Median	3,4	7,6	1,3	7,3
Max - 75th per	2,3	11,0	10,5	11,4
MEAN	11,6	15,8	18,7	20,3
SD	2,8	8,5	6,5	9,2

Tabella 4.5c: risultati ottenuti a partire dagli half-life con fit sul solo D_2 .

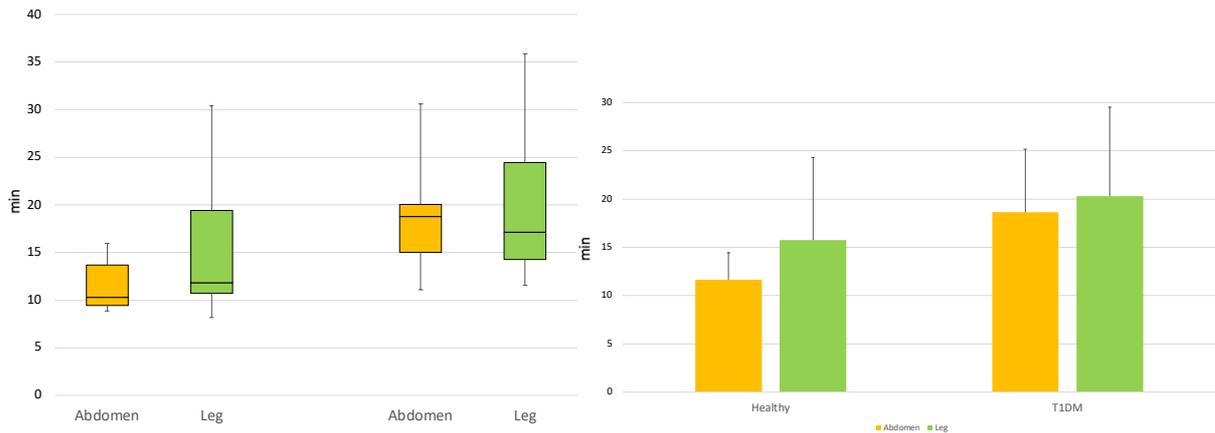


Figura 4.15b: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per l'half-life.

4.2.3 Fit su ^{13}C

Nelle seguenti figure sono riportati, per il fit eseguito sul solo tracciante ^{13}C , gli andamenti temporali medi dei dati e della predizione del modello e l'andamento temporale medio dei residui pesati. Precisamente, nelle figure 4.16a e 4.16b per i soggetti sani e nelle figure 4.17a e 4.17b per i soggetti T1DM.

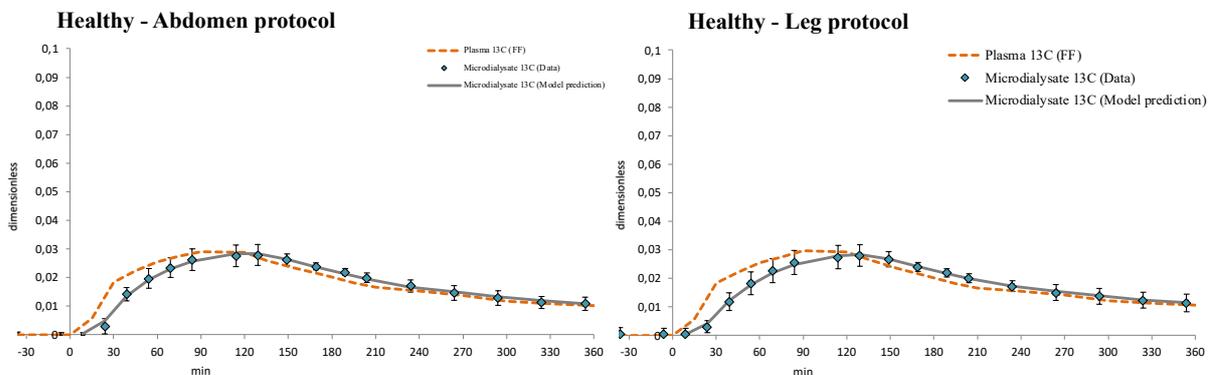


Figura 4.16a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti sani.

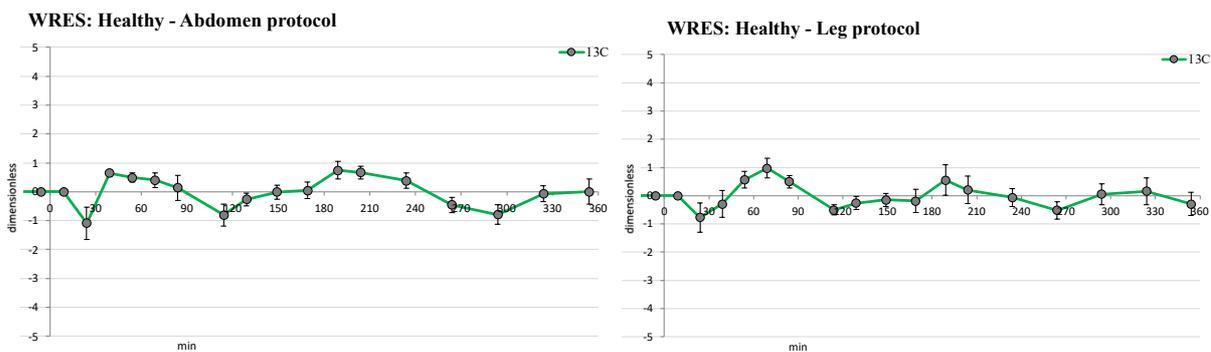


Figura 4.16b: Andamento temporale medio dei residui pesati nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti sani.

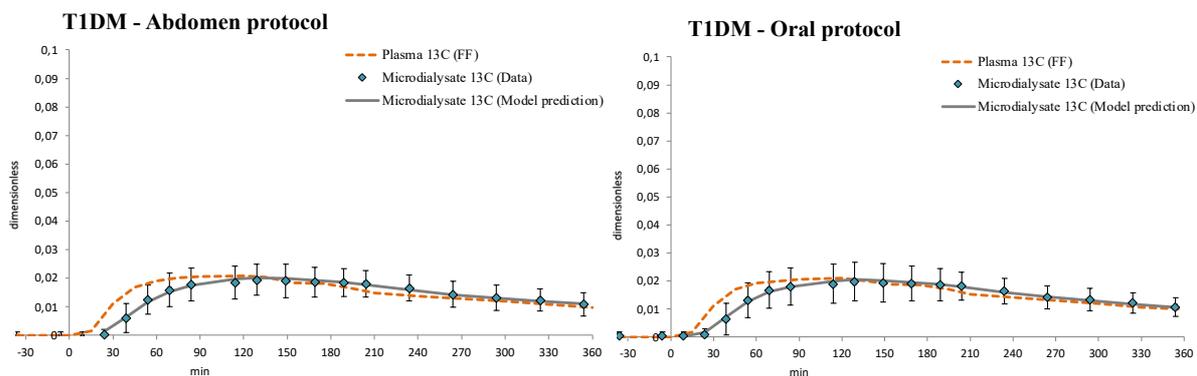


Figura 4.17a: Media dei dati e andamento temporale della predizione del modello nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti T1DM.

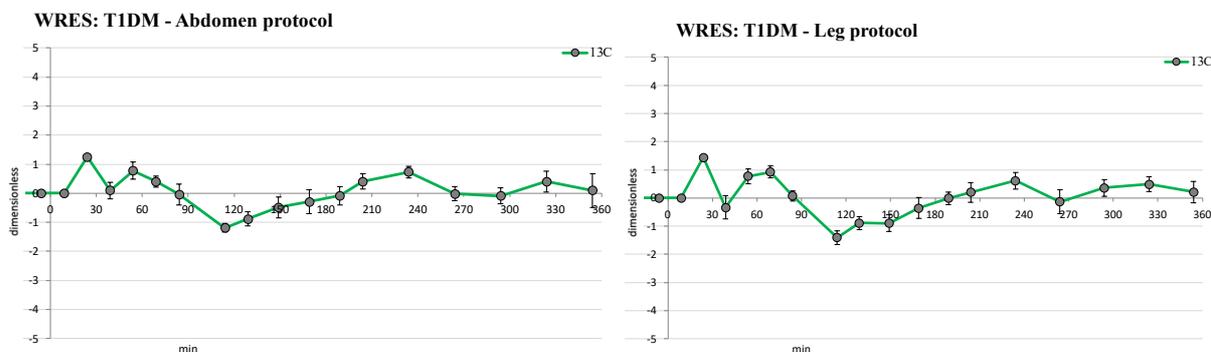


Figura 4.17b: Andamento temporale medio dei residui pesati nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome e dalla gamba nei soggetti T1DM.

Il fit è soddisfacente con residui non molto scorrelati.

I valori medi del parametro stimato, con le relative precisioni, sono riassunti nella seguente tabella e si può osservare che il parametro è stimato con precisioni molto buone: i CV medi assumono valori attorno al 10%.

	HEALTHY-ABDOMEN		HEALTHY-LEG		T1DM-ABDOMEN		T1DM-LEG	
	k_{22} [min^{-1}]	CV [%]						
MEAN	0,067	9	0,055	9	0,049	11	0,050	11
SD	0,024	3	0,022	3	0,025	4	0,022	6
SE	0,009	1	0,009	1	0,009	2	0,009	2

Tabella 4.6a: valori medi e relative precisioni delle stime dei parametri per il fit sul solo ^{13}C .

Di seguito le tabelle contenenti i valori necessari per costruire i box-plots e gli istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE), sia per il parametro stimato k_{22} che per l'*half-life*.

[min^{-1}]	Healthy		T1DM	
	Abdomen	Leg	Abdomen	Leg
Min	0,032	0,026	0,021	0,026
25th per - Min	0,021	0,011	0,010	0,009
Median - 25th per	0,006	0,029	0,010	0,008
75th per - Median	0,027	0,004	0,024	0,025
Max - 75th per	0,013	0,003	0,020	0,010
MEAN	0,067	0,055	0,049	0,050
SD	0,024	0,022	0,025	0,022

Tabella 4.6b: risultati ottenuti a partire dai k_{22} con fit sul solo ^{13}C .

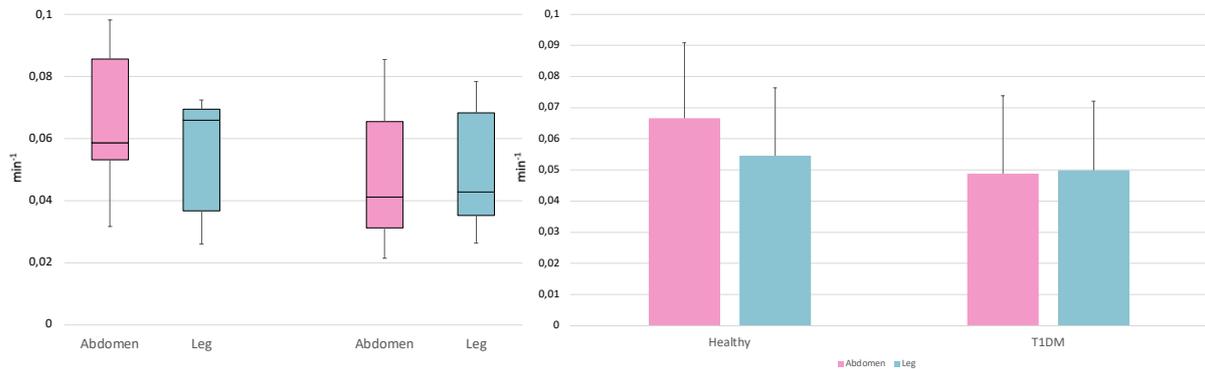


Figura 4.18a: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per il parametro k_{22} .

[min]	Healthy		T1DM	
	Abdomen	Leg	Abdomen	Leg
Min	7,1	9,6	8,1	8,8
25th per - Min	1,1	0,4	2,9	1,9
Median - 25th per	3,7	0,5	5,8	5,4
75th per - Median	1,3	11,1	6,0	3,7
Max - 75th per	8,8	5,1	9,6	6,5
MEAN	11,9	15,4	17,9	16,3
SD	5,1	8,2	9,0	6,8

Tabella 4.6c: risultati ottenuti a partire dagli *half-life* con fit sul solo ^{13}C .

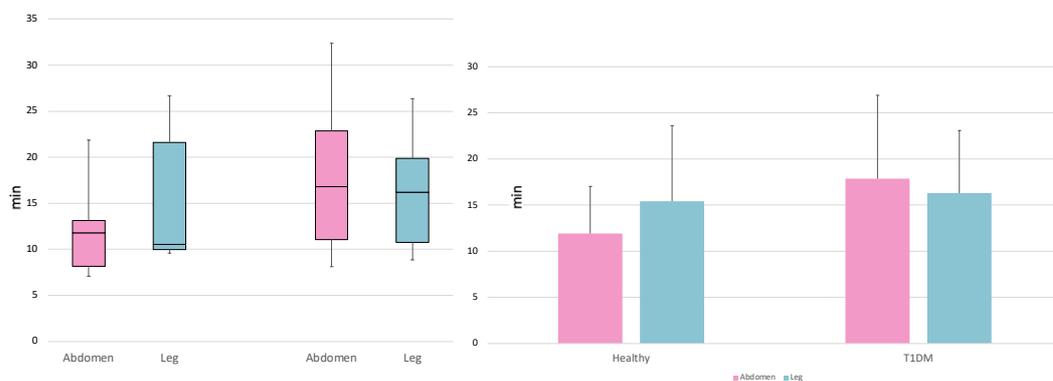


Figura 4.18b: box-plots (i primi due a sinistra si riferiscono ai soggetti sani, gli altri due a quelli diabetici) e istogrammi che rappresentano la media con le barre di errore associate allo standard error (SE) per l'half-life.

4.2.4 Confronti tra i parametri nelle diverse procedure di fit

Analogamente al precedente protocollo, nei seguenti istogrammi si possono osservare i valori assunti dal parametro stimato k_{22} raggruppati per le diverse categorie di soggetti, sani e T1DM, per le diverse sedi di misurazione di glucosio interstiziale, addome o gamba, e per le diverse procedure di fitting (solo $6,6\text{-}^2\text{H}_2$, $1\text{-}^{13}\text{C}$ o entrambi).

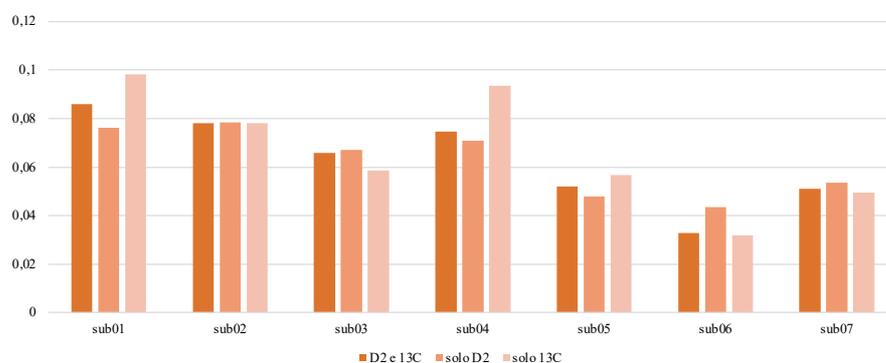


Grafico 3.9: Istogramma dei valori assunti dal parametro stimato k_{22} [min⁻¹] nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome per i soggetti sani.

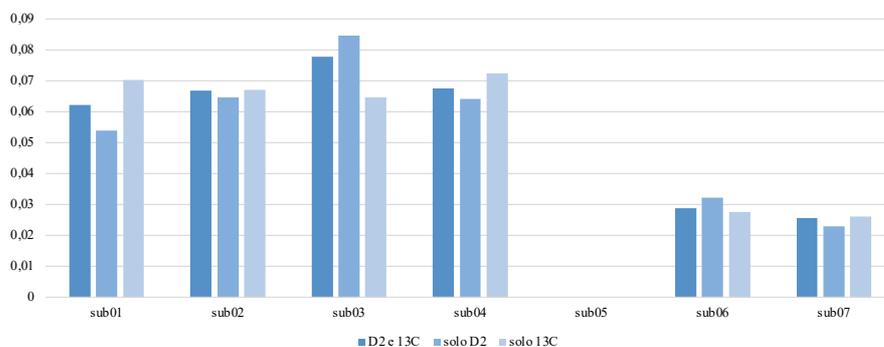


Grafico 3.10: Istogramma dei valori assunti dal parametro stimato k_{22} [min⁻¹] nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dalla gamba per i soggetti sani.

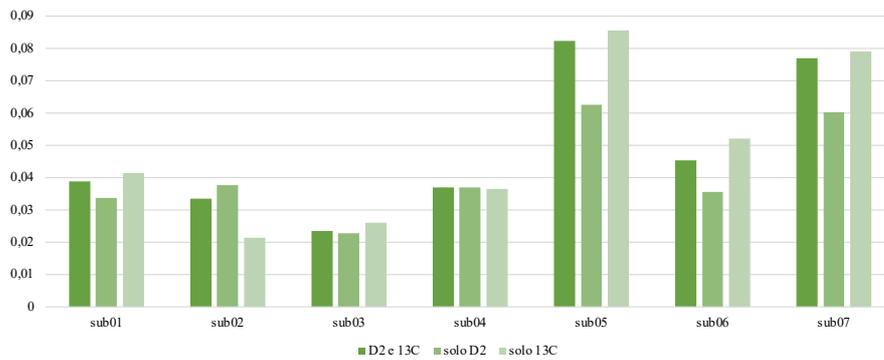


Grafico 3.11: Istogramma dei valori assunti dal parametro stimato k_{22} [min^{-1}] nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome per i soggetti T1DM.

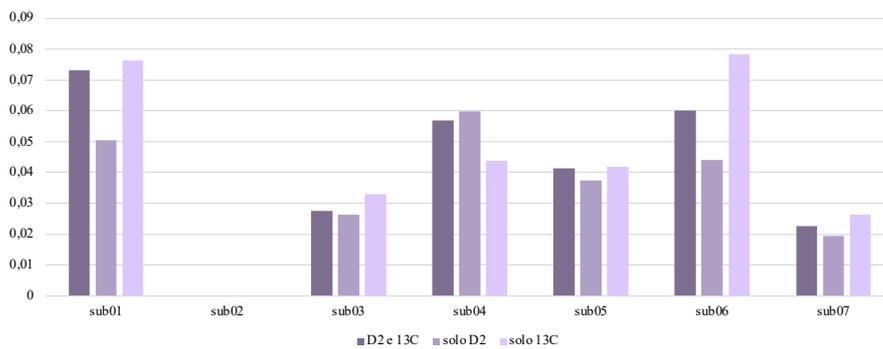


Grafico 3.12: Istogramma dei valori assunti dal parametro stimato k_{22} [min^{-1}] nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dalla gamba per i soggetti T1DM.

Anche in questo caso, a partire dai risultati ottenuti è stato calcolato l'half-life e di seguito si possono osservare gli istogrammi che confrontano il parametro derivato soggetto per soggetto a seconda della procedura di fitting applicata.

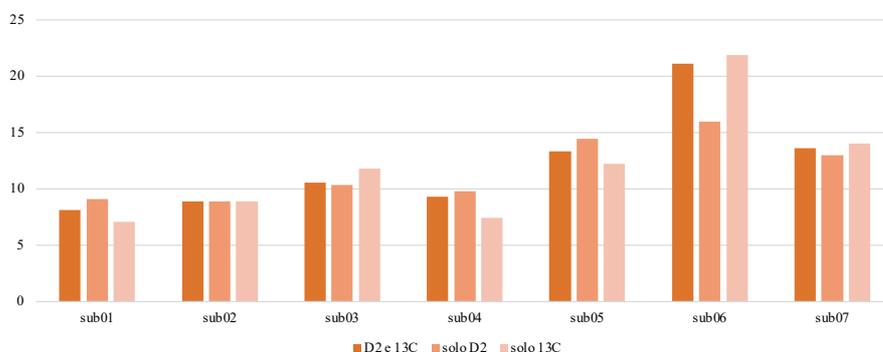


Grafico 3.13: Istogramma dei valori assunti dall'half-life [min] nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome per i soggetti sani.

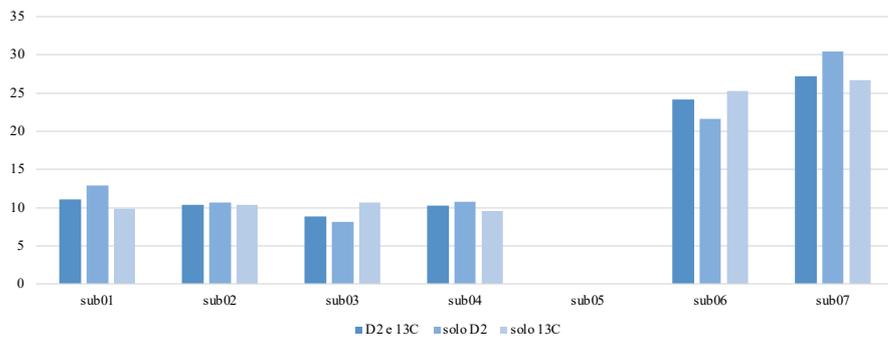


Grafico 3.14: Istogramma dei valori assunti dall'half-life [min] nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dalla gamba per i soggetti sani.

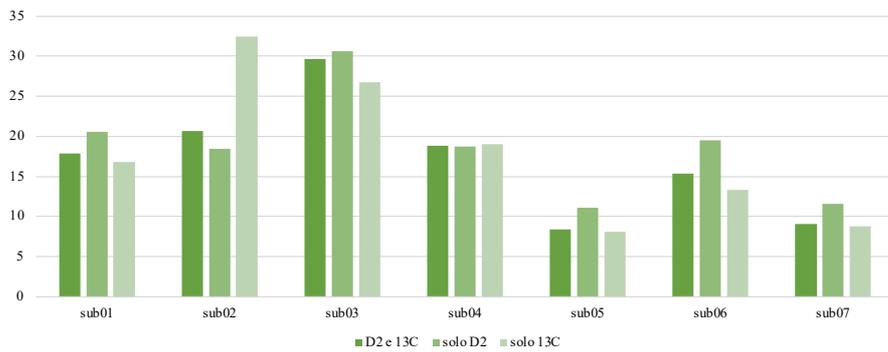


Grafico 3.15: Istogramma dei valori assunti dall'half-life [min] nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dall'addome per i soggetti T1DM.

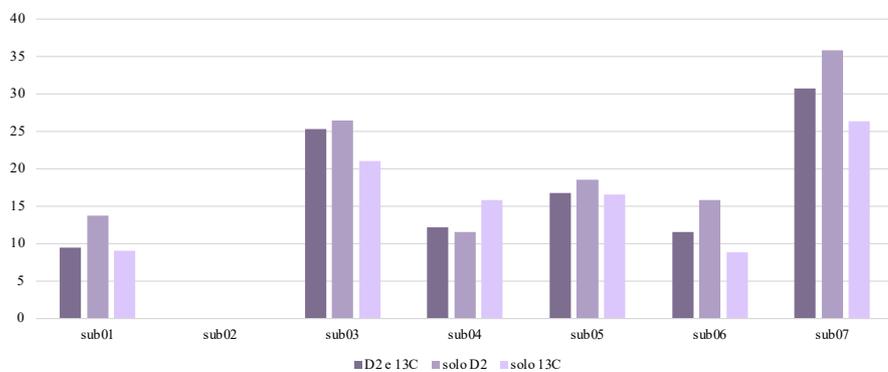


Grafico 3.16: Istogramma dei valori assunti dall'half-life [min] nel caso di misurazioni di glucosio interstiziale dalla gamba per i soggetti T1DM.

4.2.5 Risultati dell'analisi statistica della varianza (ANOVA)

Come spiegato nel paragrafo 3.3, per il protocollo Esercizio fisico:

- il vettore g_1 ha due livelli, 1 e 2, che si riferiscono a soggetti sani e T1DM rispettivamente;
- il vettore g_2 si riferisce alle diverse sedi in cui sono state eseguite le misurazioni di glucosio interstiziale, ossia 'Abdomen' o 'Leg';
- il vettore g_3 definisce se il fit è avvenuto 'solo su D_2 ', 'solo su ^{13}C ' o se contemporaneamente su entrambi i traccianti, ' D_2 e ^{13}C '.

Poi, a seconda del parametro analizzato, il vettore y contiene tutti i k_{22} o gli *half-life*. Analogamente al protocollo precedente, è importante osservare che i quattro vettori devono avere la stessa lunghezza e che gli elementi di ciascun vettore aventi lo stesso indice devono essere associati tra loro. Per esempio:

$$y(1) = 0.085873901270249;$$

$$g_1(1) = 1;$$

$$g_2(1) = \text{'Abdomen'};$$

$$g_3(1) = \text{'D2 e } ^{13}C\text{'};$$

significa che $k_{22} = 0.085873901270249 \text{ min}^{-1}$ è un parametro relativo ad un soggetto sano, l'esperimento è avvenuto con misurazione sull'addome e con fit contemporaneo sui due traccianti. Gli output ottenuti per l'analisi statistica dei parametri stimati k_{22} e degli *half-life* sono mostrati nelle seguenti figure.

Analysis of Variance					
Source	Sum Sq.	d.f.	Mean Sq.	F	Prob>F
X1	0.0037	1	0.0037	9.49	0.0029
X2	0.00051	1	0.00051	1.3	0.2582
X3	0.00045	2	0.00022	0.57	0.567
Error	0.02846	73	0.00039		
Total	0.03311	77			

Constrained (Type III) sums of squares.

Figura 5.3: Output della funzione anovan, analisi della varianza del parametro k_{22}

Analysis of Variance					
Source	Sum Sq.	d.f.	Mean Sq.	F	Prob>F
X1	381.67	1	381.669	7.89	0.0064
X2	71.02	1	71.019	1.47	0.2296
X3	20.24	2	10.12	0.21	0.8117
Error	3531.88	73	48.382		
Total	4004.81	77			

Constrained (Type III) sums of squares.

Figura 5.4: Output della funzione anovan, analisi della varianza del parametro *half-life*

L'analisi della varianza ha evidenziato differenze statisticamente rilevanti tra soggetti normali e diabetici, sia per quanto riguarda la stima del parametro k_{22} sia per l'*half-life*, essendo il p-value riferito al fattore X1 inferiore a 0.05 in entrambi i casi. Invece, per gli altri fattori di variabilità, ossia misurazione effettuata sull'addome o sulla gamba e modalità di fit, non esistono variazioni statisticamente rilevanti.

Capitolo 5.

CONCLUSIONI

Dato il beneficio, documentato da numerosi studi [13], dei sensori per il monitoraggio continuo del glucosio (CGM) per ottenere un migliore controllo generale della glicemia ed essendo lo sviluppo di un pancreas endocrino artificiale (AEP) per i pazienti diabetici di tipo 1 (T1DM) un'attuale priorità del NIH e di altre ONG, molti studi sono rivolti a migliorare la comprensione della cinetica del trasporto sottocutaneo del glucosio, ovvero a sviluppare un modello della cinetica del glucosio dal sistema vascolare al fluido interstiziale (ISF) attraverso i capillari. Così da poter sviluppare sensori e algoritmi affidabili ed efficaci che riflettano veramente, in real-time, le concentrazioni di glucosio nel plasma.

Lo scopo di questa tesi è proprio la modellizzazione della cinetica del glucosio dal plasma all'interstizio in condizioni dinamiche, ossia durante perturbazioni di glucosio e insulina, come pasti ed esercizio fisico, sia in soggetti sani che T1DM. A tal fine è stato usato una data base di soggetti, sani e T1DM, sottoposti a diversi protocolli sperimentali che prevedono l'uso di traccianti del glucosio e cateteri per microdialisi. Precisamente, uno prevede l'assunzione di un pasto con diversa modalità di somministrazione, iniezione endovenosa e somministrazione orale, l'altro prevede lo svolgimento di attività fisica, dopo l'assunzione di un pasto, e la misurazione della concentrazione di tracciante del glucosio interstiziale in due sedi diverse, nell'addome e nella gamba. I dati così ottenuti sono stati interpretati secondo un modello lineare monocompartimentale, descritto nel capitolo 3, e la sua identificazione è avvenuta seguendo il metodo Fisheriano con una tecnica ai minimi quadrati. In particolare, diversi tentativi sono stati effettuati identificando singolarmente i due traccianti iniettati o contemporaneamente entrambi. Questo ha fornito una buona predizione dei dati a disposizione e delle stime dei parametri sulla quasi totalità dei soggetti considerati, evidenziando così ottime prestazioni del modello.

Infine, attraverso un'analisi della varianza per valutare eventuali differenze statisticamente rilevanti tra diversi fattori di variabilità, quali presenza o meno della patologia, modalità sperimentale e tipologia di fit, è emerso che nel caso del primo protocollo sperimentale, quello del pasto, per il parametro *half-life* non si registrano variazioni statisticamente significative tra soggetti sani e diabetici, né per gli altri fattori di variabilità. Invece, per il parametro k_{22} emerge una differenza statisticamente rilevante tra la modalità di

somministrazione endovenosa ed orale dei traccianti. Questa inconsistenza potrebbe essere dovuta al fatto che l'half-life, ossia l'emivita, è ottenuto a partire dal parametro k_{22} mediante una trasformazione non-lineare $\left(\frac{\ln(2)}{k_{12}+k_{02}}\right)$ che ne modifica la distribuzione. Per il secondo, ossia il protocollo sperimentale che prevede anche l'esercizio fisico, la risposta è significativamente diversa tra soggetti sani e T1DM sia nel caso del parametro k_{22} sia nel caso dell'half-life.

BIBLIOGRAFIA

[1] <https://www.diabete.com/incidenza-diabete-europa-nel-mondo/>

References: Federazione Internazionale del Diabete (IDF-International Diabetes Federation),

Diabetes facts & figures: IDF Diabetes Atlas 9th Edition 2021 e altre risorse.

[2] World Health Organization. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Geneva: WHO Department of Noncommunicable Disease Surveillance, 1999.

[3] American Diabetes Association: *Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021*. Diabetes Care, December 2020; 44 (Suppl. 1): S1-S15–S33.

[4] Evan M. Benjamin: *Self-monitoring of blood glucose: the basics*. Clinical diabetes, 2002; Volume 20, Number 1, 45-47.

[6] J. R. Castle and P. G. Jacobs: *Nonadjunctive use of continuous glucose monitoring for diabetes treatment decisions*. Journal of diabetes science and technology, 2016; Volume 10, Number 5, 1169-1173.

[7] Peyser T, Dassau E, Breton M, et al.: *The artificial pancreas: current status and future prospects in the management of diabetes*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2014; 1311: 102–123.

[8] Cobelli C, Renard E, Kovatchev BP: *Artificial pancreas: past, present, future*. Diabetes, November 2011; 60: 2672–2682.

[9] Rebrin K, Sheppard NF Jr, Steil GM: *Use of subcutaneous interstitial fluid glucose to estimate blood glucose: revisiting delay and sensor offset*, Journal of Diabetes Science and Technology, September 2010; Volume 4, Issue 5: 1087–1098.

[10] Regittnig W, Ellmerer M, Fauler G, et al.: *Assessment of transcapillary glucose exchange in human skeletal muscle and adipose tissue*, Am J Physiol Endocrinol Metab 2003; 285: E241–E251.

[11] Michele Schiavon, PhD, Chiara Dalla Man, PhD, Simmi Dube, MD, Michael Slama, BS, Yogish C. Kudva, MD, Thomas Peyser, PhD, Ananda Basu, MD, Rita Basu, MD, and Claudio Cobelli, PhD: *Modeling Plasma-to-Interstitial Glucose Kinetics from Multitracer Plasma and Microdialysis Data*, Diabetes Technology and Therapeutics, 2015; Volume 17, Number 11.

[12] Carson ER, Cobelli C: *Modelling Methodology for Physiology and Medicine*. San Diego, CA: Academic Press, 2001.

[13] The Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group: *Continuous glucose monitoring and intensive treatment of type 1 diabetes*. The New England Journal of Medicine, October 2, 2008; 359:1464–1476.

[14] Eyal Dassau, PHD, Howard Zisser, MD, Rebecca A. Harvey, BS, Matthew W. Percival, PHD, Benjamin Grosman, PHD, Wendy Bevier, PHD, Eran Atlas, MSC, Shahar

Miller, BSC, Revital Nimri, MD, Lois Jovanovič, MD, and Francis J. Doyle, III, PHD: *Clinical Evaluation of a Personalized Artificial Pancreas*. *Diabetes Care*, April 2013; Volume 36: 801–809.

[15] <https://it.provider.dexcom.com/prodotti/dexcom-g6>.

[16] Kerstin Rebrin, Garry M. Steil, William P. van Antwerp, and John J. Mastrototaro: *Subcutaneous glucose predicts plasma glucose independent of insulin: implications for continuous monitoring*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, September 1, 1999; E561-E571.

[17] <https://it.mathworks.com/help/stats/anovan.html>.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Dalla Man per la disponibilità e per avermi dato la possibilità di approfondire un argomento molto interessante, che ha sicuramente contribuito alla scelta di come proseguirò i miei studi, e il Prof. Schiavon che mi ha sempre seguita con tanta attenzione e pazienza.

Ringrazio mia mamma per avermi sempre sostenuta, sopportata, appoggiata, incoraggiata e lasciata libera di inseguire i miei sogni. Tutto quello che sono lo devo a te.

Ringrazio i miei zii, Michela e Adriano, per il loro appoggio e per stare sempre vicini a me e alla mamma.

Ringrazio le mie amiche e i miei amici di sempre. Soprattutto Silvia e Lorisa, siete le sorelle che non ho mai avuto, completamente diverse ma perfettamente compatibili, e Francesco. Grazie per supportarmi e soprattutto sopportarmi e per credere in me più di quanto io già faccia.

Un grazie speciale ai miei nuovi amici con i quali ho condiviso risate, preoccupazioni e bellissimi momenti. Sono sicura che ne seguiranno tantissimi altri, siete il regalo più bello di questi tre anni.

Un grazie a me stessa, alla mia determinazione, passione, ambizione e spirito di sacrificio. Per non avere mai mollato, per lavorare continuamente su me stessa, per voler diventare la migliore versione di me e per spingermi sempre oltre anche quando la soluzione più facile e rassicurante sarebbe stare dove già sono.

Infine, un grazie anche alle persone che non fanno più parte della mia vita ma che hanno lasciato qualcosa, a volte anche solo vuoto.