

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Ingegneria
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

**Relazione tra connettività funzionale cerebrale a riposo e
variazioni glicemiche in neonati molto prematuri:
uno studio mediante monitoraggio continuo del glucosio e
spettroscopia nel vicino infrarosso**

Relatore: Dott.ssa Sabrina Brigadoi

Laureando: Giacomo Bianco

Correlatore: Guy Antony Perkins

Anno Accademico 2022 – 2023

Data di laurea 20 ottobre 2023

INDICE

ABSTRACT	1
ANALISI DELLA LETTERATURA	3
1.1 ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO E DELLE COMPLICAZIONI NEI NEONATI PREMATURI ...	3
1.2 METABOLISMO DEL GLUCOSIO	7
1.2.1 Metabolismo del glucosio nei neonati a termine	7
1.2.2 Metabolismo del glucosio nei neonati prematuri	9
1.2.3 Complicazioni causate dalle oscillazioni glicemiche nei neonati prematuri	12
1.3 MONITORAGGIO GLICEMICO CONTINUO (CGM)	15
1.3.1 Descrizione del dispositivo	15
1.3.2 Utilizzo del CGM nei neonati prematuri	16
1.3.3 Limitazioni nell'utilizzo dei sensori CGM	20
1.4 LEGAME TRA EMODINAMICA CEREBRALE E GLICEMIA NEI NEONATI PREMATURI	23
1.5 LA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO (NIRS)	28
1.5.1 Principi fisici e di funzionamento	28
1.5.2 Applicazioni in ambito neonatale	31
1.5.3 Vantaggi e limitazioni nell'utilizzo della NIRS in ambiente clinico	33
1.6 <i>RESTING STATE FUNCTIONAL CONNECTIVITY</i>	37
1.7 SCOPO DELLA TESI	41
MATERIALI E METODI	43
2.1 DESCRIZIONE DEL DATASET	43
2.2 ANALISI GLICEMICA	49
2.2.1 Standardizzazione dei tracciati CGM	49
2.2.2 Definizione di evento glicemico ed intervallo di euglicemia	51
2.2.3 Gestione dei gap temporali	53
2.2.4 Definizione delle metriche glicemiche	57
2.3 SELEZIONE DEL CAMPIONE RAPPRESENTATIVO	60
2.4 ANALISI NIRS	64

2.4.1 Generazione delle <i>head mesh</i> e calcolo delle matrici di sensitività	64
2.4.2 Criteri per la ricerca della migliore finestra in euglicemia.....	67
2.4.3 Pipeline per la correzione ed elaborazione del segnale NIRS	72
2.4.4 Ricostruzione delle immagini DOT	76
2.5 ANALISI DELLA <i>RESTING STATE FUNCTIONAL CONNECTIVITY</i>	78
2.5.1 Definizione delle <i>Region Of Interest</i>	78
2.5.2 Calcolo della <i>Resting State Functional Connectivity</i>	81
2.5.3 Definizione delle metriche emodinamiche	83
2.6 CORRELAZIONE TRA EVENTI GLICEMICI E <i>RESTING STATE FUNCTIONAL CONNECTIVITY</i> ..	84
RISULTATI	85
3.1 REPORT SULL'ATTIVITÀ GLICEMICA	85
3.1.1 Risultati dell'analisi glicemica.....	85
3.1.2 Selezione del campione rappresentativo	92
3.1.3 Calcolo delle metriche glicemiche.....	93
3.2 RISULTATI DELL'ANALISI NIRS	95
3.3 RISULTATI DELLA CORRELAZIONE TRA EVENTI GLICEMICI E <i>RESTING STATE FUNCTIONAL CONNECTIVITY</i>	99
DISCUSSIONE	107
CONCLUSIONI.....	123
BIBLIOGRAFIA	125
APPENDICE	135

ABSTRACT

I neonati molto prematuri (nati prima delle 32 settimane di gestazione) sono più esposti a variazioni glicemiche critiche nei primi giorni dopo il parto. L'instabilità glicemica neonatale, definita come una serie di eventi ipo- e/o iperglicemici, sembra essere associata ad un incremento del tasso di mortalità e morbidità, così come ad un compromesso sviluppo neurologico e cognitivo. Alcuni studi presenti in letteratura hanno dimostrato una relazione tra i valori della concentrazione di glucosio e dell'emodinamica cerebrale. Il glucosio è uno dei più importanti metaboliti cerebrali; di conseguenza, la sua diminuzione o eccessivo incremento può provocare variazioni importanti dell'emodinamica cerebrale che possono influire nello sviluppo encefalico.

L'obiettivo principale di questa tesi consiste nell'indagare se gli eventi glicemici in neonati molto prematuri durante i primi giorni di vita possono modificare e modulare i pattern della connettività funzionale cerebrale a riposo.

Il dataset a disposizione, unico nel suo genere, consiste in 47 neonati prematuri i cui dati glicemici ed emodinamici sono stati acquisiti presso la terapia intensiva neonatale dell'ospedale Universitario di Padova durante la prima settimana di vita, tra marzo 2020 e giugno 2023. Il segnale glicemico è stato rilevato attraverso l'utilizzo di un sensore di monitoraggio continuo del glucosio (CGM) per un minimo di 20 ore ed un massimo di 6 giorni; durante questo periodo, l'emodinamica cerebrale è stata acquisita tramite tomografia ottica diffusa (DOT). Il dispositivo utilizzato per eseguire la DOT (NTS Gowerlabs) è composto da 8 sorgenti e 8 rilevatori, per un totale di 64 canali posizionati sulla zona cerebrale parietale, motoria, occipitale superiore, temporale superiore e frontale posteriore.

Il segnale glicemico è stato analizzato per identificare e classificare gli eventi glicemici, nonché per calcolare la durata degli intervalli di euglicemia. Gli eventi glicemici sono definiti nel seguente modo: ipoglicemia moderata (47-71 mg/dL), ipoglicemia severa (< 47 mg/dL), iperglicemia moderata (145-180 mg/dL) e iperglicemia severa (> 180 mg/dL). Da questa analisi, 38 pazienti sono stati esclusi sulla base dei seguenti criteri: presenza di gap temporali critici all'interno del segnale CGM, presenza di eventi glicemici antecedenti alla prima finestra

di euglicemia rilevata o poiché il tempo totale trascorso in un evento glicemico è minore della soglia corrispondente al 25° percentile calcolato in riferimento all'intero dataset. Per l'analisi dell'emodinamica cerebrale, due finestre da cinque minuti sono state identificate all'interno del primo ed ultimo intervallo di euglicemia rilevato, scegliendo la finestra migliore in base al numero minore di canali rimossi, meno artefatti da movimento ed una sufficiente copertura della superficie corticale da parte dell'array di canali utilizzato. Il segnale DOT è stato pre-processato rimuovendo i canali rumorosi e poco informativi e prestando particolare attenzione all'attenuazione degli artefatti da movimento attraverso l'applicazione di una strategia basata sul filtraggio Wavelet. L'analisi della connettività cerebrale funzionale a riposo (rsFC) è stata effettuata utilizzando una strategia *seed based* valutando la correlazione tra 9 ROI identificate sulla base del sistema internazionale 10-20 dell'EEG. La differenza delle matrici di rsFC è stata messa in relazione con alcune metriche glicemiche estratte dai tracciati CGM (ad esempio, variabilità glicemica, numero di ipoglicemie, durata degli eventi glicemici, etc.).

Al termine dell'analisi esplorativa si sono riscontrate 24 correlazioni statisticamente significative per il segnale relativo all'emoglobina ossigenata e 39 per la controparte deossigenata. Nella maggior parte sono coinvolte ROI appartenenti alla regione parietale (P3, Pz, P4) presupponendo una maggiore presenza di possibili lesioni o sofferenze cerebrali in quella zona. Dopo aver effettuato la correzione per confronti multipli, rimangono solamente due correlazioni positive statisticamente significative tra l'alterazione della rsFC per HbR in F3-P3 con, rispettivamente, l'*Absolute Average Rate of Change* e il Coefficiente di Variazione del segnale CGM. Sebbene queste metriche siano entrambe riferite alla variazione glicemica, la loro formulazione è diversa. La presenza di una forte correlazione positiva uguale per i due parametri sopracitati fa presupporre che vi sia una relazione tra la variabilità glicemica e la differenza della connettività cerebrale nella coppia di ROI F3-P3, per quanto riguarda la popolazione analizzata.

I risultati ottenuti in questa tesi possono supportare futuri studi relativi al controllo glicemico e al suo impatto sull'emodinamica cerebrale, per valutarne l'effetto nel breve e lungo periodo in relazione al neurosviluppo dei neonati molto prematuri.

CAPITOLO 1

ANALISI DELLA LETTERATURA

1.1 ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO E DELLE COMPLICAZIONI NEI NEONATI PREMATURI

Come viene riportato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), è stato stimato che le complicazioni dovute ad un parto pretermine sono responsabili per il 35% delle 3.1 milioni di morti neonatali annue e rappresenta la seconda causa di morte nei bambini al di sotto dei 5 anni [1]. L'OMS definisce formalmente un parto pretermine quando avviene prima del completamento della 37° settimana di gestazione o antecedente al 259° giorno trascorso dal primo giorno dell'ultimo ciclo mestruale. È necessaria un'ulteriore suddivisione per definire il grado di prematurità. In base all'età gestazionale un neonato può essere definito: estremamente prematuro (< 28 settimane), molto prematuro (28 – 32 settimane) o moderatamente prematuro (32 – 37 settimane). Questa classificazione è essenziale poiché è stato dimostrato che al diminuire dell'età gestazionale è associato un aumento delle probabilità di mortalità, disabilità e di sviluppo di malattie croniche in età adulta [2].

Un parto pretermine può avvenire in maniera indotta o spontanea. Il primo caso comprende tutte le procedure chirurgiche o farmacologiche che inducono e velocizzano la nascita prematura del neonato. Questa operazione è necessaria qual ora la salute della madre o del nascituro sia a rischio. Ad esempio, alcune condizioni materne che possono compromettere la gravidanza consistono nell'insorgenza di emorragie interne, diabete, pressione alta, problemi renali o cardiaci o distacco della placenta; per i neonati la causa più comune che richiede l'induzione di un parto prematuro è la diagnosi di ritardo di crescita intrauterino (IUGR). I parti prematuri spontanei sono causati dall'attivazione di molteplici meccanismi molecolari che terminano con il rilascio di mediatori come le interleuchine e le prostaglandine che stimolano la contrazione del miometrio con conseguente rottura della membrana fetale. Questi processi

molecolari sono influenzati da fattori genetici, epigenetici, biologici, clinici, socio-comportamentali e ambientali [3].

Uno studio epidemiologico sulla prematurità di Steer et al. [4] ha analizzato il North West Thames database, un archivio contenente dati per 517381 nascite avvenute tra il 1988 e il 2000 nell'area a nord di Londra. Da questa analisi è stato riscontrato che il peso della madre può incidere sulla possibilità di avere un parto pretermine. Si è dimostrato che in condizione di sottopeso (BMI <17) la probabilità di nascita prematura è del 7%, sensibilmente più elevata rispetto a quella rilevata in condizione di sovrappeso (BMI > 26) che risulta essere pari al 5.5%. Inoltre, vi è una relazione inversamente proporzionale con l'altezza della madre. Un'altezza inferiore a 1.46 m corrisponde ad una probabilità del 6%, mentre per un'altezza superiore a 1.75 m tale parametro è inferiore al 3%. Si deve tenere in considerazione anche la presenza di diabete, nel North West Thames database il 17% dei bambini nati da madre diabetica risultano essere prematuri. Altri fattori degni di nota che aumentano il rischio di sperimentare parti pretermine sono: età adolescenziale o avanzata della donna, gravidanze derivate da fecondazione assistita o troppo ravvicinate nel tempo, storia familiare o esperienza pregressa di prematurità, abuso di sostanze stupefacenti o di tabacco durante la gestazione, fattori clinici e ambientali.

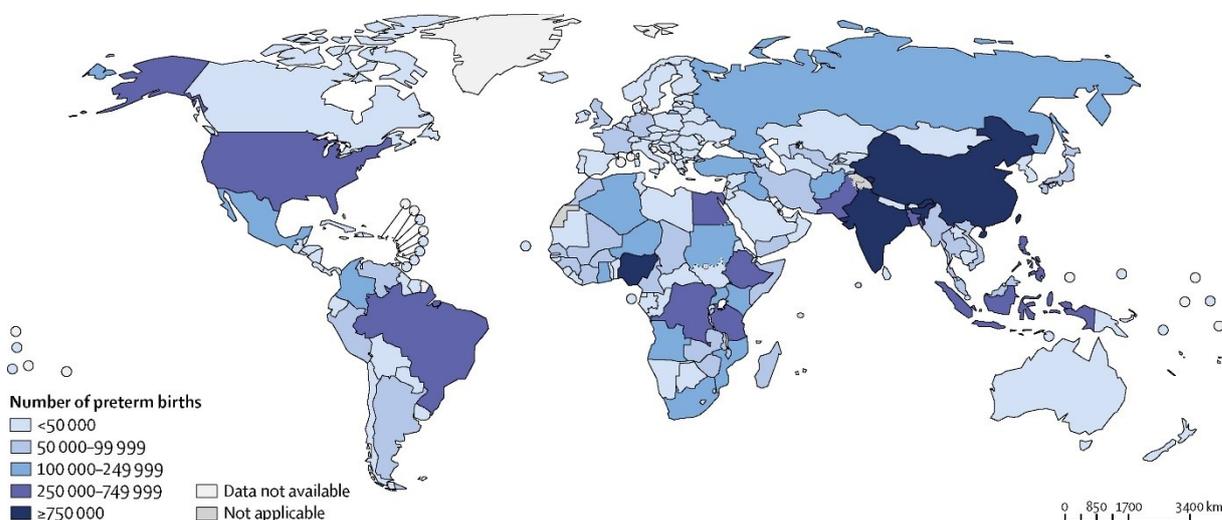


Fig. 1. Stima del numero di parti pretermine per ogni stato del mondo nel 2014. Preso da [5].

Delle oltre 15 milioni di nascite pretermine l'anno, l'85% avviene nel range delle 32-36 settimane di gestazione. Solo il 5% sono catalogate come estreme (<28 settimane) mentre il restante 10% avvengono nell'intervallo 28-32 settimane. Questi numeri sono da considerarsi solamente delle stime poiché la disponibilità e qualità dei dati globali è molto limitata. Per quantificare le settimane di gestazione sono necessari degli esami strumentali specifici, non

disponibili in tutte le parti del mondo. È stato rilevato che nei paesi in via di sviluppo il tasso di natalità pretermine è sensibilmente più elevato rispetto ad aree ad alto reddito. Questo non è dovuto soltanto ad una scarsa assistenza sanitaria ma è provocato anche da batteri, virus e malnutrizione [6]. Tramite una revisione sistematica della letteratura scientifica e da un sofisticato modello statistico, nel 2014 è stato stimato che l'81% dei neonati prematuri sono nati in nazioni dell'Africa Subsahariana e del sud Asia. Infatti, nel 2014 gli stati con il più alto numero stimato di nascite pretermine sono: India, Cina, Nigeria e Bangladesh (fig. 1) [5].

Dal punto di vista di un neonato, la nascita prematura lo espone a numerosi rischi sia nel breve che nel lungo periodo. È stato dimostrato che gli infanti pretermine hanno una probabilità sensibilmente più elevata di sviluppare problemi respiratori rispetto ai corrispettivi nati a termine. L'enterocolite necrotizzante è osservata quasi esclusivamente nei neonati prematuri, di cui un terzo richiede un trattamento chirurgico. I pazienti sottoposti a tale procedura sono esposti ad un maggior rischio di sviluppare complicazioni a lungo termine. Anche la vista potrebbe essere compromessa da una nascita pretermine. Lo sviluppo di una retinopatia può scatenare un deficit visivo nel 3% dei neonati molto prematuri. Il 25% dei bambini appartenenti a tale gruppo necessitano l'uso di occhiali entro i sei anni a seguito della comparsa di miopia e ipermetropia. Sebbene in piccola parte, i neonati molto prematuri possono sviluppare deficit dell'udito con una probabilità 25 volte superiore rispetto alla popolazione generale di bambini. I rischi a lungo termine sono nella maggior parte dei casi legati ad un ritardo o alterazione dello sviluppo neurologico. La condizione più comune sviluppata dai neonati prematuri è la paralisi cerebrale che si manifesta tramite problemi motori e di coordinazione. La probabilità di incorrere in queste problematiche aumenta al diminuire dell'età gestazionale. È stato rilevato un tasso di incidenza del 14.6% (intervallo di confidenza IC: 12.5 – 17%) nei neonati estremamente prematuri, il quale si riduce al 6.2% (IC: 4.9 – 7.8%) tra i molto prematuri fino al 0.7% (IC: 0.6-0.9%) nei moderati. Inoltre, una diagnosi di epilessia è molto comune sia in caso di paralisi cerebrale sia in casi isolati. Per concludere, un neonato pretermine su tre può sviluppare deficit cognitivi rilevanti che possono incidere nei processi di apprendimento in età evolutiva [7].

Come riportato in uno studio di Cheong et al. [8], l'ambiente ospedaliero e il dolore possono provocare alterazioni nello sviluppo neurologico nei neonati pretermine. È utile ricordare che dopo il parto il neonato viene immediatamente trasferito in terapia intensiva neonatale (TIN). La degenza nei primi giorni di vita in questo reparto espone il paziente a intensi stimoli sensoriali come suoni, luci e forti dolori. All'interno della TIN il neonato viene sottoposto ad interventi considerati salva vita ma che spesso risultano essere dolorosi come, ad esempio,

prelievi di sangue, inserimento di sonda nasogastrica o endotracheale, ventilazione assistita o vere e proprie operazioni chirurgiche. È stato dimostrato che un numero elevato di procedure invasive è associato ad alterazioni dello sviluppo cerebrale che comportano una riduzione della maturazione di alcune strutture cerebrali come la materia bianca, l'area subcorticale della materia grigia e il talamo.

In letteratura sono presenti alcuni studi che analizzano la relazione tra queste condizioni cliniche ed un'alterazione della regolazione glicemica nei neonati prematuri. Il loro organismo, infatti, non è in grado di controllare in maniera adeguata la concentrazione di glucosio nel sangue. È stato riscontrato che l'incidenza di eventi glicemici (iperglicemia e ipoglicemia) aumentano con il grado di prematurità del neonato nei primi giorni successivi al parto, alterando l'omeostasi del glucosio [9]. Nel prossimo paragrafo verrà descritto nel dettaglio il metabolismo del glucosio nei neonati prematuri analizzando le complicazioni provocate dalla comparsa di eventi glicemici.

1.2 METABOLISMO DEL GLUCOSIO

1.2.1 Metabolismo del glucosio nei neonati a termine

In questo paragrafo verranno descritti i processi principali che portano ad una corretta gestione della concentrazione di glucosio nei primi istanti di vita in neonati a termine.

Il glucosio è la maggior risorsa di energia per lo sviluppo fetale e la sua omeostasi durante questa fase dipende interamente dal glucosio materno trasferito in maniera continua tramite il cordone ombelicale. Non essendo prodotto direttamente dal feto, la sua riserva di glucosio è in perfetto equilibrio con quella materna. L'ambiente endocrino fetale è caratterizzato da un'elevata concentrazione di insulina e un basso livello di glucagone: il primo ormone ha il compito di inibire il metabolismo del glucosio mentre il secondo ne aumenta la sua produzione. La presenza di insulina nel feto è rilevata a partire dalle 13 settimane di gestazione ma solamente dopo 20 settimane il pancreas del nascituro è in grado di rilasciare autonomamente tale ormone in risposta ad un aumento della concentrazione di glucosio. L'aumento di insulina intracellulare inibisce completamente la gluconeogenesi, la quale impedisce al fegato di produrre glucosio in seguito ad una diminuzione della sua concentrazione. La sintesi di glicogeno, un polimero in grado di immagazzinare energia e rilasciarla in caso di necessità, inizia durante il secondo trimestre di gestazione e raggiunge la massima velocità di produzione alla 36° settimana. I processi finora descritti consentono al feto di immagazzinare una quantità significativa di grassi sottoforma di tessuto adiposo durante l'ultimo trimestre di gravidanza. L'elevata presenza di grassi e di glicogeno al momento della nascita è responsabile dei cambiamenti metabolici che caratterizzano i primi istanti di vita del neonato [10].

I cambiamenti metabolici al momento della nascita sono regolati in modo tale da garantire un continuo apporto di nutrienti al cervello e agli organi vitali finché l'alimentazione tradizionale non fornisce il fabbisogno energetico necessario. Subito dopo il parto la concentrazione di glucosio nel sangue diminuisce rapidamente per poi stabilizzarsi attraverso l'attivazione della glicogenolisi e gluconeogenesi in risposta a cambiamenti di insulina, cortisolo, glucagone e catecolamine. Questo avviene al termine della risposta endocrina al parto. Dopo il taglio del cordone ombelicale, l'apporto di glucosio materno si interrompe bruscamente. Questo evento comporta un elevato stress endocrino che provoca la secrezione massiccia di catecolamine e glucagone nel plasma. Il livello di insulina diminuisce e di conseguenza si riduce il rapporto insulina/glucagone. In questa situazione, viene promossa la glicogenolisi, la lipolisi e la gluconeogenesi. Tutti questi processi, uniti alla rottura delle proteine muscolari, comportano un

aumento della concentrazione di glucosio nel sangue, giocando un ruolo fondamentale nell'omeostasi. È utile sottolineare che la produzione di glucosio epatico tramite i processi di glicogenolisi e gluconeogenesi sono l'unica risorsa di glucosio a disposizione del neonato prima che si proceda all'allattamento. In figura 2 sono riportati gli step che caratterizzano la glicogenolisi e il suo percorso complementare di glicogenesi. Un rapido calo di insulina provoca la produzione di glicogeno fosforilasi, un enzima che consente la degradazione dei depositi di glicogeno in glucosio-6-fosfato. L'azione del glucosio-6-fosfatasi consente di effettuare l'ultimo taglio enzimatico necessario per ottenere il glucosio nella sua forma finale. Al termine di questo processo, la concentrazione di glucosio del sangue aumenta mentre quella di glicogeno epatico diminuisce da 50 mg/g fino a 5 mg/g nelle prime 12 ore di vita. Viceversa, un aumento di insulina e una contemporanea diminuzione di glucagone innescano la glicogenesi. Tale processo consiste nella conversione di glucosio-6-fosfato in glicogeno, riducendo la concentrazione di glucosio nel sangue [11].

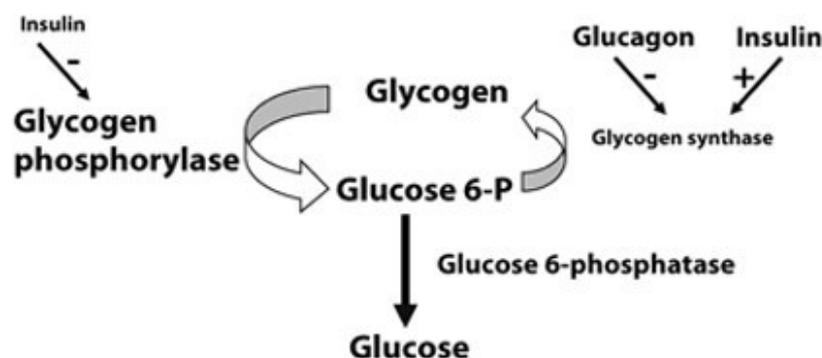


Fig. 2. Percorsi biologici di glicogenesi e glicogenolisi. Una diminuzione di insulina provoca un aumento della concentrazione di glucosio nel plasma. Viceversa, un aumento di insulina e una diminuzione di glucagone porta ad immagazzinare il glucosio sottoforma di glicogeno, diminuendone la concentrazione nel plasma. Preso da [11].

Il secondo processo che consente la produzione di glucosio nelle prime ore successive al parto è la gluconeogenesi. In questo percorso il prodotto finale è generato a partire da molecole non classificate come carboidrati. Esso, infatti, è un meccanismo di difesa che l'organismo attiva in caso di digiuno prolungato. Questa fase consente anche di eliminare molecole potenzialmente tossiche per l'organismo se presenti ad alte concentrazioni, come il lattato ed alcuni amminoacidi. La gluconeogenesi non è presente immediatamente dopo il parto poiché il suo enzima regolatore (fosfoenolpiruvato carbossichinasi, PEPCK) non risulta essere particolarmente attivo. Infatti, solo una lenta diminuzione del rapporto insulina/glucagone attiva il gene che consente l'inizio della formazione del PEPCK. Di conseguenza, la produzione di glucosio tramite questo percorso inizia in media due ore dopo il parto e raggiunge il suo picco a 12 ore dalla nascita. Per completezza espositiva, è utile descrivere brevemente anche il

percorso inverso a quello appena descritto. La glicolisi è un processo metabolico che consente di scindere una molecola di glucosio in due molecole di piruvato a seguito di un aumento della concentrazione di insulina nel plasma. Tramite questo processo si produce energia e viene diminuita la presenza di glucosio nell'organismo [12].

Una volta prodotto il glucosio è necessario trasportarlo in maniera efficace a tutti i tessuti che ne richiedono l'utilizzo. I trasportatori del glucosio (GLUT) sono una famiglia di proteine transmembrana che consentono il passaggio passivo di tale molecola dal plasma alle cellule dei vari tessuti utilizzando il gradiente di diffusione. I GLUT-1 sono i trasportatori presenti in qualsiasi tessuto e in particolare abbondanza nella barriera ematoencefalica. Di particolare interesse sono i GLUT-3 i quali presentano una spiccata affinità al glucosio e sono presenti nelle zone dell'encefalo dove la sua richiesta è più elevata. Per completezza espositiva, GLUT-2 sono presenti nei tessuti del fegato, intestino, pancreas e reni; mentre, i GLUT-4 sono maggiormente concentrati nei muscoli scheletrici, cardiaci e nei tessuti adiposi. È importante sottolineare che l'ossidazione del glucosio può supportare solamente il 70% dell'energia richiesta dal cervello per un suo funzionamento fisiologico. I corpi chetonici e l'acido lattico sono delle alternative energetiche essenziali. Nelle prime ore successive al parto la produzione di queste molecole è elevata. È stato inoltre dimostrato che nei neonati con un peso alla nascita appropriato all'età gestazionale, la produzione di corpi chetonici e acido lattico garantiscono un apporto appropriato di energia per sostenere il metabolismo cerebrale [11].

1.2.2 Metabolismo del glucosio nei neonati prematuri

Nel paragrafo precedente sono stati descritti i meccanismi biologici principali che caratterizzano il metabolismo del glucosio in neonati a termine. Verranno ora elencate le maggiori differenze che si possono osservare in un neonato prematuro. Esso, infatti, può andare incontro ad alterazioni transitorie dell'omeostasi del glucosio nei primi istanti di vita, sperimentando picchi ipoglicemici ed iperglicemici.

Nelle prime ore successive al parto vi è un'ampia diminuzione della concentrazione di glucosio. Il processo di glicogenolisi è limitato nei neonati con un'età gestazionale minore alle 28 settimane poiché le riserve epatiche di glicogeno si sviluppano principalmente nell'ultimo trimestre di gravidanza. Di conseguenza, nei neonati pretermine il percorso principale per la produzione di glucosio risulta essere la gluconeogenesi. Nonostante ciò, alcuni studi hanno suggerito che anche questo meccanismo è fortemente limitato a causa dell'imaturità del

glucosio-6-fosfatasi, enzima finale che consente di rifinire il glucosio e renderlo utilizzabile [11], [13], [14]. Dunque, l'elevato tempo necessario a produrre gli enzimi coinvolti nella gluconeogenesi e le limitate riserve di glicogeno epatico rendono la probabilità di eventi di natura ipoglicemica nelle ore successive alla nascita molto alta. Inoltre, la chetogenesi e la lipolisi sono significativamente limitate nei neonati pretermine poiché la percentuale di tessuto adiposo rappresenta in media solamente il 2% dell'intero peso corporeo. Un risultato interessante ottenuto in uno studio di Hawdon et al. [15] ha dimostrato che, in contrasto con quanto si può osservare nei neonati a termine, in caso di prematurità dove è richiesta l'alimentazione assistita vi è una correlazione positiva tra la concentrazione di chetoni nel sangue e il volume di nutrizione enterale somministrata. Una possibile causa è da ricercare nella presenza di enzimi della chetogenesi all'interno del composto utilizzato per l'alimentazione. Alcune condizioni cliniche altamente frequenti nei neonati prematuri possono aumentare il rischio di eventi ipoglicemici. Ne sono un esempio l'asfissia perinatale, l'ipossia, la sepsi e l'ipotermia. Gli infanti nati pretermine incontrano maggiori difficoltà a controbilanciare queste oscillazioni glicemiche e faticano a fornire un apporto adeguato di nutrienti al cervello. Per questo motivo anche le ipoglicemie moderate possono incidere negativamente nello sviluppo neurologico. Alcune strategie utilizzate in terapia intensiva neonatale per limitare l'insorgenza di questa tipologia di eventi consistono nel regolare attentamente la temperatura dell'incubatrice e fornire il prima possibile l'alimentazione parenterale poiché è dimostrato stimolare l'adattamento metabolico postnatale. Inoltre, è consigliato procedere all'allattamento nel momento in cui è tollerato dal neonato [11].

Per contrastare l'insorgenza di ipoglicemia e mantenere l'omeostasi è necessario provvedere ad un apporto continuo di glucosio. Tuttavia, in questo modo i neonati prematuri possono sperimentare numerosi eventi di iperglicemia durante la prima settimana di vita. È stato dimostrato che in un neonato con peso alla nascita minore di 1000 g la probabilità di manifestare eventi di iperglicemia è 18 volte più elevata rispetto ad un infante di 2000 g. Data questa relazione inversamente proporzionale tra peso alla nascita e livello di iperglicemia, si può concludere che il grado di prematurità può avere un ruolo cruciale nella fisiopatologia degli eventi iperglicemici [16].

Alcuni studi hanno dimostrato che il livello di insulina nel plasma nei neonati prematuri è più elevato rispetto al valore fisiologico. Nonostante le β -cellule del pancreas siano regolarmente sensibili ad un aumento di glicemia nel plasma, la secrezione di insulina avviene prevalentemente sottoforma di proinsulina inattiva. Poiché i neonati prematuri non sono in grado di effettuare il taglio proteolitico che ne provoca l'attivazione, questa proteina è dieci

volte meno efficaci rispetto all'insulina matura e non consente un controllo preciso della concentrazione di glucosio nel plasma. In figura 3 sono riportati i risultati ottenuti in un esperimento condotto da Mitanchez-Mokhtari et al. [17] su una popolazione di neonati prematuri per valutare la concentrazione di proinsulina, insulina e C-Peptide durante un evento di iperglicemia e in condizioni di euglicemia. Come riportato in figura 3, la concentrazione di proinsulina è significativamente maggiore quando quella di glucosio nel sangue è elevata, viceversa non sono state osservate differenze statisticamente rilevanti per le concentrazioni di insulina e C-peptide, frammento peptidico liberato a seguito del taglio proteolitico durante il processo di attivazione dell'insulina. Questi risultati sottolineano l'abbondanza di proinsulina e la relativa inabilità dei neonati pretermine a regolare la concentrazione di glucosio nel sangue durante eventi di iperglicemia.

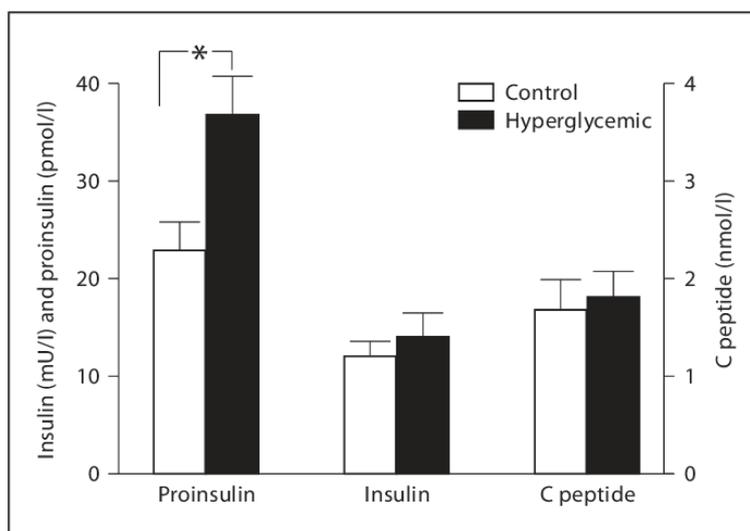


Fig. 3. Concentrazione nel plasma di proinsulina, insulina e C-Peptide in condizione di euglicemia ed iperglicemia in neonati prematuri con età gestazionale minore di 30 settimane. Si può osservare una differenza statisticamente significativa nella concentrazione di proinsulina (p -value = 0.006). Preso da [17].

Nei neonati prematuri è stato riscontrato un ridotto livello di glucagone nel plasma, aumentando di conseguenza il rapporto insulina/glucagone. Questa condizione non consente l'attivazione del percorso di gluconeogenesi e inibisce la relativa produzione di glucosio. Nonostante ciò, sono state rilevate situazioni di iperglicemia la cui causa è da ricercare a livello enzimatico. I trasportatori specifici GLUT-2 consentono al fegato di rilasciare o riassorbire glucosio in seguito ad alterazioni nella concentrazione di tale molecola nel plasma. Prima di entrare nei vari processi metabolici, il glucosio viene assorbito e convertito in glucosio-6-fosfato all'interno degli epatociti. Questa modifica viene effettuata da un enzima insulinodipendente chiamato glucochinasi. Di conseguenza, poiché nei neonati prematuri vi è una drastica diminuzione di insulina nel fegato dovuta alla loro scarsa capacità di produrla in forma attiva, gli epatociti non sono in grado di metabolizzare il glucosio in maniera efficiente e di

conseguenza la sua concentrazione nel sistema circolatorio aumenta sensibilmente. In aggiunta, tessuti adiposi e muscolari sono meno abbondanti nei neonati prematuri e quindi non sono sufficienti ad assimilare l'eccesso di glucosio. Tutti i processi appena elencati, associati ad una spiccata insulinoresistenza, possono influire negativamente nel *reuptake* del glucosio periferico e aumentare la probabilità di sperimentare eventi di natura iperglicemica [18].

1.2.3 Complicazioni causate dalle oscillazioni glicemiche nei neonati prematuri

Nel paragrafo precedente è stata riportata la patofisiologia delle oscillazioni glicemiche che caratterizzano i primi giorni di vita dei neonati prematuri. Verranno ora descritte le principali complicazioni che si possono osservare in relazione ad eventi glicemici ricorrenti.

Nei neonati prematuri l'incidenza di eventi iperglicemici nelle prime ore successive al parto è stimata tra il 45% e l'80%. È importante sottolineare che questo dato può non essere preciso in quanto non vi è uno standard unico né per la definizione di iperglicemia né per il metodo con cui deve essere valutata. L'eterogeneità dei protocolli utilizzati compromette un'accurata analisi dell'incidenza di questa tipologia di eventi [19]. In letteratura sono presenti numerosi studi che analizzano le complicazioni a breve e a lungo termine della presenza di iperglicemia [20]–[22]. Nel periodo neonatale è stata associata ad un aumento del rischio di morte, emorragia intraventricolare (IVH), sepsi, necrosi, enterocolite necrotizzante e una prolungata degenza ospedaliera. In particolare, è stato dimostrato che una prolungata e severa permanenza in iperglicemica aumenta al 40% il tasso di mortalità provocato da una emorragia intraventricolare. L'aumento patologico della concentrazione di glucosio nel sangue può velocizzare la progressione di infezioni batteriche o fungine. In maniera simile, il meccanismo ormonale attuato dall'organismo in risposta ad una situazione di sepsi può causare o peggiorare lo stato di iperglicemia [20]. Poiché il cervello è il principale utilizzatore di glucosio, una situazione di iperglicemia può indicare la presenza di lesioni cerebrali. L'encefalo va incontro ad una rapida crescita e maturazione nel periodo compreso tra le 20 e le 32 settimane di gestazione. Ne consegue che gli infanti nati in questa finestra temporale sono più soggetti a traumi cerebrali e ritardi nello sviluppo del sistema nervoso centrale. Uno studio di Alexandrou et al. [21] ha identificato una correlazione tra la presenza di iperglicemia nelle prime 24 ore di vita e una riduzione del volume della materia bianca in neonati estremamente prematuri (< 28 settimane di gestazione) rispetto a neonati a termine. Alcuni risultati ottenuti in questo studio

hanno evidenziato un comportamento ossidativo dell'iperglicemia che può provocare danni alle cellule cerebrali. In questo contesto, la riduzione della materia bianca può essere causata da un'estrema vulnerabilità degli oligodendrociti durante il loro percorso di maturazione e sviluppo.

A differenza delle complicazioni acute, gli effetti a lungo termine dai ripetuti eventi iperglicemici nelle prime ore di vita di un neonato pretermine sono difficili da valutare ed in letteratura le informazioni sono poche e spesso discordanti. Nonostante ciò, le principali complicazioni riportate corrispondono a ritardi nella crescita, nello sviluppo neurologico, differenze nella composizione corporea e problemi di natura cardiaca. Un importante studio longitudinale condotto da Ramel et al. [20] ha cercato una possibile relazione tra iperglicemia e alterazioni biologiche in neonati con meno di 30 settimane di gestazione o con un peso alla nascita inferiore a 1500 g. L'innovazione introdotta da questo studio consiste in una standardizzazione dei processi utilizzati per ottenere dei risultati il più possibile riproducibili. In particolare, hanno selezionato solamente i pazienti che hanno sperimentato un evento iperglicemico in almeno 5 dei 14 giorni successivi al parto e, per valutare lo sviluppo cognitivo, hanno impiegato alcune scale internazionali. Nella popolazione esaminata gli autori hanno riscontrato una significativa diminuzione a 12 mesi dalla nascita nei punteggi delle scale Bayley per lo sviluppo infantile relativi agli ambiti cognitivi, motori e del linguaggio rispetto ai valori standard per neonati a termine. A 4 mesi dalla nascita nel gruppo dei soggetti prematuri si è evidenziata una diminuzione significativa del tessuto adiposo mentre a 2 anni si è riscontrato un minore peso, circonferenza e lunghezza cranica rispetto alla popolazione nata a termine. Questi parametri si normalizzano solamente al raggiungimento del settimo anno di vita; permangono però differenze significative sull'altezza e sulla percentuale di massa magra. I meccanismi fisiologici alla base di queste alterazioni non sono ancora noti; tuttavia, gli autori hanno ipotizzato un ruolo fondamentale nelle procedure cliniche adoperate per limitare l'iperglicemia. Infatti, è prassi diminuire l'apporto di nutrienti nella prima settimana di vita per evitare escursioni glicemiche troppo elevate. Di conseguenza questa riduzione può essere associata ad effetti a lungo termine sullo sviluppo fisico e neurologico, nonché sul metabolismo e sulla produzione dell'ormone della crescita. Nonostante ciò, i risultati presenti in letteratura sono altamente discordanti e confusionari. Per questo motivo non è ancora possibile affermare con ragionevole certezza che gli eventi di iperglicemia possono essere utilizzati come biomarcatori per identificare precocemente dei ritardi nella crescita e nello sviluppo neurologico in neonati pretermine o che prevenire l'insorgenza di questi eventi comporti una prognosi migliore sullo sviluppo fisico e cerebrale nel prematuro [22].

Viceversa, in letteratura vi sono numerosi studi che analizzano in maniera esaustiva gli effetti a breve e a lungo termine delle ipoglicemie neonatali ricorrenti dal momento che, a prescindere dall'età, sono considerate più pericolose per la salute. La frequenza di questa tipologia di eventi è del 9.18% nei neonati, la percentuale aumenta al 45-50% se il peso alla nascita è inferiore a 1500 g e può raggiungere il 70% nel caso di neonati classificati come estremamente prematuri. La maggior parte di questi eventi risulta essere di natura asintomatica [23].

L'ipoglicemia neonatale è stata associata alla comparsa nel breve periodo di numerose condizioni cliniche come asfissia perinatale, ipossia, sepsi, ipotermia, epilessia, alterazione delle funzioni motorie e disturbi della vista [11]. Per quanto riguarda lo sviluppo cerebrale, è stato dimostrato che nei neonati dichiarati piccoli per età gestazionali (SGA) vi è una forte relazione tra gli eventi ipoglicemici e una limitata circonferenza cranica a 12, 18 e 60 mesi di età. Inoltre, poiché la proliferazione gangliare è un processo che avviene nel terzo trimestre di gravidanza e prosegue dopo la nascita, l'ipoglicemia neonatale provoca un ritardo nello sviluppo degli astrociti principalmente nelle aree del talamo, nei vermi cerebellari, nel tronco encefalico, nella corteccia sensomotora e occipitale [24]. Come riportato da Sharma et. al. [14], alcuni studi neurologici tramite risonanza magnetica (MRI) hanno evidenziato che in presenza di eventi ipoglicemici si possono sviluppare processi ischemici, emorragie intraparenchimali, lesioni della materia bianca e della corteccia cerebrale a prescindere dallo stato e grado di prematurità. Inoltre, sono state rilevate alterazioni dei gangli della base, specialmente nelle zone del talamo e della dorsale del globo pallido. In generale, la materia bianca presente nel lobo occipitale e parietale posteriore risulta essere più vulnerabile. È dunque possibile che le lesioni cerebrali provocate da eventi ipoglicemici possono incidere nella crescita del sistema nervoso e causare ritardi dello sviluppo, paralisi cerebrali e altri deficit neurocognitivi che vengono frequentemente rilevati in neonati prematuri. Uno studio di Burns et al. [25], condotto su una popolazione di 35 neonati a termine con sintomatologia ipoglicemica neonatale, ha riscontrato anomalie nella materia bianca nel 94% dei soggetti. Lesioni severe sono state rilevate nella parte posteriore nel 29% dei casi. Gli autori hanno valutato gli effetti nel neurosviluppo a 18 mesi usando le scale di valutazione nella prima infanzia di Griffith. Nel 65% dei partecipanti si è rilevato un deficit nello sviluppo, il cui grado di severità è correlato con l'estensione del danno alla materia bianca e al coinvolgimento del ramo posteriore della capsula interna.

Riassumendo, la variabilità glicemica nei neonati pretermine risulta essere in relazione diretta con l'aumento dei rischi a cui il bambino è esposto, sia nel breve che nel lungo periodo. Per questo motivo è ragionevole ipotizzare che un controllo e una correzione tempestiva e accurata della glicemia nelle ore successive al parto possa prevenire sviluppi futuri di deficit cognitivi.

1.3 MONITORAGGIO GLICEMICO CONTINUO (CGM)

1.3.1 Descrizione del dispositivo

L'introduzione nel mercato di dispositivi in grado di rilevare la concentrazione di glucosio nel sangue in tempo reale ha di fatto rivoluzionato il trattamento e la gestione del diabete e di tutte le patologie che provocano variazioni glicemiche ricorrenti. La tecnica più utilizzata all'interno dei sensori per il monitoraggio continuo del glucosio (CGM) si basa sul processo di ossidazione del glucosio. In particolare, il CGM è composto da un elettrodo di platino rivestito da uno strato di glucosio ossidasi posto all'interno di un catetere inserito sottocute con lo scopo di catalizzare il processo di ossidazione del glucosio. Questo meccanismo produce gluconolattone, perossido di idrogeno e un segnale di corrente elettrica che viene trasformato in valori di concentrazione di glucosio a seguito di un processo di calibrazione utilizzando alcuni campioni giornalieri ottenuti tramite l'automonitoraggio glicemico (SMBG) [26].

L'utilizzo del primo prototipo di CGM è stato approvato dalla U.S. Food and Drug Administration nel 1999 per l'analisi retrospettiva dei valori glicemici in uno studio sul diabete di tipo 1. Questo sensore, tuttavia, era caratterizzato da pesanti limitazioni come la scarsa accuratezza dei campioni rilevati. Si è quindi reso necessario definire alcune metriche per valutare la bontà dei sensori nell'acquisire dei valori il più possibile simili a quelli ottenuti tramite l'uso di sofisticate apparecchiature biomedicali, definite ancora oggi come il *gold standard* per la quantificazione della concentrazione di glucosio nel sangue. La metrica più utilizzata in letteratura per valutare l'accuratezza dei sensori CGM è la *Mean Absolute Relative Difference* (MARD) calcolata come la media della differenza assoluta tra i campioni acquisiti dal sensore e quelli rilevati tramite il metodo *gold standard*. L'obiettivo corrente è quello di produrre sensori in grado di ottenere un'accuratezza simile a quella garantita dal SMBG, stabilita in un intervallo tra il 5% ed il 10%. Nel 2004 l'azienda statunitense Medtronic ha commercializzato il primo dispositivo di monitoraggio CGM per uso personale, il quale consentiva di acquisire dati ogni 5 minuti per tre giorni e di generare allarmi in caso di ipoglicemia o iperglicemia. È importante sottolineare, però, che questi dispositivi considerati di prima generazione sono caratterizzati da MARD che si aggirano intorno al 15%. Il primo prodotto di nuova generazione commercializzato è stato il Medtronic Enlite® dell'omonima casa produttrice (fig. 4). Nonostante fosse caratterizzato da un MARD elevato (13.6%), tale dispositivo consentiva l'utilizzo fino a 6 giorni consecutivi, era di dimensioni e peso contenuto, resistente all'acqua e poteva immagazzinare localmente informazioni glicemiche fino a 10 ore

in caso di scollegamento del ricevitore. Nel 2012 la Dexcom, un'altra azienda statunitense, ha introdotto il G4 Platinum® con MARD del 13%. Questo sensore è stato il primo ad aver installato al suo interno un algoritmo di analisi preliminare che consentiva di inviare al ricevitore i dati già elaborati, velocizzandone la trasmissione e riducendone l'ingombro in memoria. Un altro dispositivo degno di nota è il Dexcom G5 Mobile® che nel 2015 con un MARD del 9% inviava direttamente i dati al cellulare dell'utente senza bisogno di una ricevente dedicata. Nel 2017 è stato prodotto il primo sensore di ultima generazione, il Dexcom G6®. Tale dispositivo consente un utilizzo fino a 10 giorni, ha un MARD del 9% e per la prima volta non richiede alcun tipo di calibrazione *in vivo*. Per riassumere, le aziende biomedicali sono orientate a produrre sensori CGM indossabili e miniaturizzati che soddisfino i requisiti di biocompatibilità, durabilità, sicurezza, sensibilità e specificità [27]. Al momento, tuttavia, questi dispositivi sono marchiati CE per uso clinico ma solo nella popolazione adulta e pediatrica, non in quella neonatale.

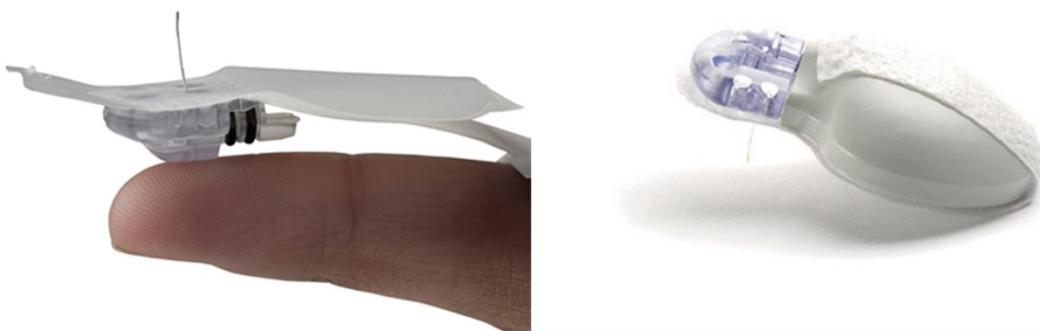


Fig. 4. Sensore Medtronic Enlite®. A sinistra si possono osservare le dimensioni contenute dell'elettrodo e del catetere sottocutaneo. A destra è riportato il sensore completo di trasmittente necessaria ad inviare i dati ad un dispositivo esterno. Preso da: <https://www.medtronicdiabetes.com/treatments/continuous-glucose-monitoring>.

1.3.2 Utilizzo del CGM nei neonati prematuri

Come riportato nel paragrafo 1.2.2, i neonati prematuri presentano una spiccata variabilità glicemica nelle prime ore di vita comportando numerosi problemi nel breve e lungo periodo. In terapia intensiva neonatale è importante riuscire ad ottenere informazioni in tempo reale sul profilo glicemico del neonato per poter procedere ad una tempestiva correzione nel caso in cui la concentrazione di glucosio esca dal range di sicurezza.

Nei neonati pretermine non è possibile identificare i sintomi degli eventi glicemici come avviene nella popolazione adulta, in quanto le variazioni glicemiche sono, nella maggior parte dei casi, asintomatiche. L'unico modo per rilevarli correttamente è quello di avere a disposizione delle misure sulla glicemia. Il *gold standard* consiste nel prelievo di un campione ematico da sottoporre a specifici test di laboratorio. L'utilizzo di sofisticati macchinari consente di ottenere un valore accurato e preciso di glicemia. Tuttavia, questa metodologia richiede volumi significativi di sangue, una puntura dolorosa per il neonato ed un elevato tempo di attesa per ottenere i risultati. Per questo motivo non si può utilizzare nella gestione acuta delle oscillazioni glicemiche. Inoltre, nei neonati pretermine si deve limitare la frequenza con cui si effettuano i prelievi di sangue poiché questa procedura risulta essere particolarmente dolorosa e rischiosa. Effettuare un campionamento rado della glicemia aumenta il rischio di non rilevare eventuali eventi glicemici asintomatici ma significativi dal punto di vista clinico. Per tutte queste motivazioni è necessario utilizzare un metodo alternativo di valutazione della glicemia che risulti essere preciso, accurato, rapido, semplice da utilizzare e il più possibile non invasivo [28].



Fig. 5. Sensore per il monitoraggio continuo del glucosio e trasmettitore correttamente posizionato nella coscia laterale di un neonato. Si possono apprezzare le ridotte dimensioni del dispositivo. Preso da [29].

Come riportato nel paragrafo precedente, l'utilizzo del sensore CGM ha il potenziale per poter essere utilizzato in TIN come aiuto fondamentale nella gestione della variabilità glicemica nei neonati prematuri (fig. 5). Tuttavia, il suo utilizzo può avvenire solo su autorizzazione del Ministero della Sanità, in quanto tale dispositivo, ad oggi, possiede, come detto sopra, un marchio CE clinico non specifico per la popolazione neonatale. Il CGM può fornire informazioni utili per comprendere la patofisiologia degli eventi glicemici neonatali. Di seguito verranno riportati alcuni studi che supportano l'utilizzo del sensore CGM in terapia intensiva neonatale per pazienti prematuri.

Il primo grande *trial* clinico effettuato utilizzando il CGM in neonati prematuri è stato lo studio NIRTURE finanziato dall'università di Cambridge. I risultati ottenuti hanno dimostrato che, in tutti i 389 soggetti reclutati, il sensore CGM è stato ben tollerato, anche in caso di prematurità estrema (23/24 settimane di gestazione). Inoltre, il dispositivo non ha provocato infezioni, lesioni significative della cute e non ha interferito con le procedure cliniche [30]. Come riportato nel paragrafo 1.1, il dolore sperimentato nei primi giorni di vita può aumentare le probabilità della comparsa di lesioni cerebrali come alterazioni della materia bianca. Per questo motivo è utile indagare il livello di invasività del dispositivo CGM nei neonati. In uno studio condotto da Galderisi et al. [31] è stato valutato il grado di dolore provocato dall'inserimento del CGM nei neonati prematuri rispetto a quello causato dalla procedura standard (prelievo di sangue dal tallone con puntura: stick glicemico). È stato riscontrato che il 20% del dolore procurato in TIN si riferisce alla procedura dello stick glicemico, effettuata nel tallone per i neonati. Lo studio è stato condotto su 50 soggetti nati prima della 32^o settimana di gestazione o con un peso alla nascita minore di 1500 g. Per quantificare il dolore provocato dalle due procedure in analisi è stata utilizzata la scala *Premature Infant Pain Profile* (PIPP) la quale tiene in considerazione non solo l'età gestazionale e il comportamento del neonato, ma anche parametri oggettivi come il livello di saturazione, il battito cardiaco e la durata di precise espressioni facciali che si possono ricondurre al dolore. Tramite una regressione multivariata, lo stick glicemico è risultato essere più correlato ad un elevato punteggio PIPP rispetto all'applicazione del sensore CGM, con aumenti anche nei singoli parametri comportamentali e clinici. Va ricordato inoltre che il sensore CGM va inserito una sola volta e può essere lasciato in situ solitamente per una settimana. In definitiva si è riscontrato che l'applicazione del CGM provoca meno dolore rispetto allo stick glicemico, riducendo sensibilmente il numero di procedure dolorose sperimentate da un neonato nella prima settimana di vita in TIN.

In letteratura stanno aumentando sensibilmente il numero di studi nei quali si cerca di valutare l'impatto del CGM in ambiente clinico per il trattamento della variabilità glicemica nei neonati prematuri. Di particolare interesse è il trial clinico internazionale REACT condotto in 13 terapie intensive neonatali nel Regno Unito, Spagna e Olanda, nel quale sono stati reclutati 180 neonati prematuri caratterizzati da un'età gestazionale inferiore alle 34 settimane ed un peso alla nascita minore di 1200 g. L'obiettivo primario di questo studio è di valutare se l'utilizzo del CGM rispetto alla terapia standard consente di aumentare il tempo speso all'interno dell'intervallo di euglicemia. A tal proposito, i 180 soggetti sono stati assegnati in maniera random in uno dei due gruppi terapeutici (CGM attivo o terapia standard con CGM cieco). Al termine dell'analisi statistica dei dati si è riscontrato che nel gruppo CGM attivo il tempo trascorso in euglicemia è

maggiore rispetto al gruppo in terapia standard, nel quale il campionamento glicemico è intermittente (94% vs 84%). Attraverso un processo di correzione dei risultati, è stato osservato che i pazienti sottoposti alla terapia standard *offline* sono stati in media 13 ore in più al di fuori dall'intervallo di euglicemia rispetto al gruppo nel quale la glicemia è stata corretta in tempo reale grazie agli allarmi generati dal sensore CGM. Inoltre, un'analisi secondaria ha rilevato che i soggetti sottoposti alla terapia standard hanno sperimentato almeno un episodio ipoglicemico in più rispetto al gruppo con CGM attivo, corrispondente ad una media di un'ora. Questo risultato dimostra come l'utilizzo del CGM può consentire di rilevare anche gli eventi glicemici "silenziosi", i quali in caso di campionamento glicemico intermittente non possono essere identificati [32].

Alcuni studi hanno suggerito l'utilizzo del sensore CGM come supporto alla regolazione della perfusione di insulina con l'obiettivo di mantenere stabile la concentrazione di glucosio all'interno dell'intervallo di euglicemia [33]–[35]. Queste evidenze hanno portato diversi ricercatori a chiedersi se l'utilizzo di un "pancreas artificiale" possa avere nei neonati prematuri gli stessi effetti positivi riscontrati nella popolazione adulta. A tal proposito uno studio pilota condotto da Galderisi et al. [36] ha dimostrato che l'utilizzo del sensore CGM all'interno di un sistema *closed loop* per il controllo automatico della somministrazione di glucosio in neonati prematuri è associato ad *outcome* positivi. In particolare, è stato osservato che nei pazienti sottoposti a questa terapia il tempo totale percentuale speso nel range di euglicemia è statisticamente più elevato rispetto alla popolazione nella quale non è stato utilizzato il sensore CGM (84% vs 68% con $p\text{-value} < 0,001$). Inoltre, è stata riscontrata anche una diminuzione della variabilità glicemica in termini di deviazione standard e coefficiente di variazione.

In questi studi sono stati riportati i potenziali benefici dell'utilizzo del sensore per il monitoraggio continuo del glucosio in ambito neonatale. La loro applicazione provoca meno dolore al paziente rispetto ai ricorrenti stick glicemici o alle analisi di laboratorio, le quali richiedono anche di prelevare un elevato volume di sangue. Inoltre, essendo minimamente invasivi non interferiscono con eventuali altre procedure cliniche. Dal punto di vista terapeutico, la tempestiva gestione di eventi glicemici sembra ridurre i potenziali danni cerebrali dovuti a condizioni di disglucemia, anche se in letteratura sono presenti risultati discordanti a riguardo. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per poter valutare i benefici clinici a lungo termine. Inoltre, si deve tenere in considerazione che l'utilizzo del sensore CGM non è privo di limitazioni. Nel prossimo paragrafo verranno elencate le principali problematiche che caratterizzano questo dispositivo.

1.3.3 Limitazioni nell'utilizzo dei sensori CGM

Sebbene i sensori CGM siano tuttora utilizzati per la prevenzione e il trattamento di alcune patologie come il diabete mellito di tipo 1, vi sono ancora alcune problematiche importanti da risolvere.

I dispositivi CGM che si basano sulla reazione di ossidazione del glucosio sono soggetti a numerose limitazioni come una possibile interferenza con alcuni principi attivi dei farmaci (paracetamolo e acido ascorbico) e la loro dipendenza in termini di sensibilità e specificità dalla riserva enzimatica presente sulla superficie dell'elettrodo. I sensori CGM che si basano su questa tecnologia misurano la concentrazione di glucosio presente nel liquido interstiziale. Poiché le variazioni glicemiche nel plasma impiegano circa 5/10 minuti per essere osservate nel liquido interstiziale, il sensore CGM è caratterizzato da un ritardo temporale. Questo aspetto non è rilevante negli studi retrospettivi ma diventa una limitazione critica se si usa il dispositivo per prendere delle decisioni terapeutiche in tempo reale. Per risolvere questo problema è necessario intervenire a livello di algoritmo e concedere un paio di minuti al sensore per raggiungere il punto di operatività dopo essere stato correttamente posizionato e azionato. Le aziende produttrici stanno sviluppando nuovi sistemi di rilevamento della concentrazione di glucosio da utilizzare in alternativa ai sensori biochimici tradizionali nelle nuove generazioni di CGM. Si stanno esplorando nuove strategie basate sull'utilizzo di alcune proprietà ottiche. In particolare, questa tipologia di sensori non è sensibile alle interferenze elettromagnetiche, sono semplici da progettare e hanno un costo di produzione limitato. Altri principi fisici utilizzati come alternativa ai processi tradizionali sfruttano la fluorescenza, la spettroscopia di Raman o nel vicino infrarosso. In figura 6 è riportato l'Eversense[®] (Senseonics Inc.), il primo sensore CGM completamente impiantabile approvato dalla FDA che sfrutta la fluorescenza per rilevare la concentrazione di glucosio nel plasma. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per poterne validare le prestazioni in ambito clinico neonatale [27].

Un'altra problematica da considerare nell'utilizzo dei sensori CGM di ultima generazione riguarda la sicurezza dei dati acquisiti. Sebbene siano caratterizzati da un basso potere computazionale, questi dispositivi risultano particolarmente deboli e facilmente *hackerabili*. Di conseguenza si devono adottare adeguati protocolli di sicurezza per garantire la confidenzialità dei dati sensibili dei pazienti [27].



Fig. 6. Sensore CGM Eversense®. A sinistra è rappresentato il dispositivo sottocutaneo, le cui dimensioni sono inferiori ad una moneta da 2 centesimi di euro. Al centro è riportata la trasmittente da posizionare sopra il sensore mediante una banda adesiva. A destra l'applicazione mobile utilizzata per visualizzare i dati glicemici in tempo reale. Preso da: <https://www.ascensiadiabetes.com/eversense>.

Le limitazioni dell'utilizzo del CGM in ambito clinico riguardano principalmente quattro aspetti fondamentali. Sebbene il sensore venga fornito con un kit di inserimento, esso non è stato concepito per l'utilizzo in neonati prematuri dove la presenza di tessuto sottocutaneo è fortemente limitata. Di conseguenza, il corretto posizionamento del dispositivo può risultare in alcuni casi complicato e richiede la presenza di personale correttamente addestrato. Come affermato in precedenza, un altro aspetto importante da tenere in considerazione è l'accuratezza dello strumento. Dato il ritardo temporale tra il valore misurato nel liquido interstiziale e la controparte nel plasma, il CGM al momento non può essere utilizzato come uno strumento diagnostico. Tuttavia, l'abbondanza di dati rilevati dal sensore può essere utilizzata come supporto alla gestione del glucosio prevedendo anticipatamente gli eventi glicemici. Di fondamentale importanza per poter ottenere delle misure il più possibili accurate sono le calibrazioni del sensore. Poiché avvengono in media due volte al giorno, se esse sono effettuate durante un periodo di particolare variabilità glicemica il valore utilizzato può non rispecchiare la realtà e compromettere le future misure. Inoltre, se non vengono eseguite entro un tempo limite il dispositivo smette di funzionare creando dei gap temporali all'interno del segnale CGM. Sebbene le case produttrici stiano sperimentando dispositivi in grado di autocalibrarsi, il loro utilizzo in ambiente neonatale non è stato ancora testato. Infine, non vi è una metodologia standard per l'interpretazione clinica dei dati acquisiti. Non sono ancora chiari i rischi a cui si espone il neonato in caso di una errata terapia provocata da misure glicemiche non accurate [37].

Nonostante queste limitazioni, la letteratura scientifica suggerisce che il sensore CGM può essere utilizzato nella gestione degli eventi glicemici neonatali. Tuttavia, non è ancora chiaro se il suo impiego ha degli effetti positivi sullo sviluppo neurologico del bambino. Poiché il cervello ha bisogno di una notevole quantità di ossigeno e di nutrienti, e il glucosio è la principale fonte di energia cerebrale, è interessante verificare se e come la variabilità glicemica sperimentata alla nascita nei neonati prematuri può influire sull'emodinamica cerebrale.

1.4 LEGAME TRA EMODINAMICA CEREBRALE E GLICEMIA NEI NEONATI PREMATURI

In questo paragrafo verranno descritte le relazioni che si ipotizzano essere alla base del legame tra l'emodinamica cerebrale e il livello di glicemia nel sangue nei neonati prematuri. A tal proposito, prima di presentare i risultati più interessanti pubblicati in letteratura, è necessario descrivere brevemente il flusso sanguigno cerebrale e il principio dell'accoppiamento neurovascolare.

Il cervello è responsabile di un consumo pari al 20% dell'ossigeno disponibile nell'organismo per svolgere le sue funzioni fisiologiche; un suo continuo apporto è dunque essenziale per la sopravvivenza. In una condizione di riposo, il flusso sanguigno totale è mantenuto costante dalla resistenza vascolare esercitata dalle grandi arterie e dalle arteriole parenchimali che irrorano il cervello. Per consentire una corretta risposta all'elevata richiesta metabolica da parte dei tessuti neurali, è necessaria una fine regolazione e coordinazione tra l'attività neurale e il flusso sanguigno che giunge al parenchima cerebrale. Poiché nelle aree ad alta attività neurale è richiesto un apporto maggiore di ossigeno, la componente vascolare del tessuto cerebrale si deve coordinare per concentrare una maggiore quantità di sangue in quelle zone. Questo è possibile tramite una progressiva contrazione e rilassamento delle arterie per generare ed aumentare il flusso sanguigno [38]. Il flusso sanguigno cerebrale (CBF) è determinato da due fattori: la resistenza al flusso ematico nei canali vascolari cerebrali (CVR) e la pressione di perfusione cerebrale (CPP). Quest'ultima grandezza è definita come il gradiente di pressione netto all'interno del letto vascolare cerebrale. Per definire il CBF, i due parametri sopracitati sono uniti dalla seguente relazione:

$$CBF = \frac{CPP}{CVR} \quad (1.1)$$

La resistenza cerebrovascolare è generata dal tono vascolare delle arterie, il quale è direttamente controllato dai nervi nella giunzione neuromuscolare, dalle secrezioni paracrine dalle cellule endoteliali e dall'azione locale di alcuni ormoni specifici. Il tono vascolare è mediato da una complessa catena di segnali biochimici. È dimostrato che l'angiotensina II, prodotta localmente all'interno delle arterie, ha proprietà di vasocostrizione mentre il monossido di azoto ha proprietà di vasodilatazione. È importante sottolineare che una inibizione della produzione endogena di quest'ultima molecola si riflette in una riduzione del CBF. L'eccitazione dei nervi parasimpatici causa un rilascio di acetilcolina che insieme al peptide intestinale vasoattivo causa

la vasodilatazione. D'altro canto, è stato dimostrato che il rilascio di noradrenalina e adrenalina provoca vasocostrizione nei neonati. La pressione di perfusione cerebrale (CPP) è definita come la differenza tra la pressione cerebrale arteriosa e venosa. In condizioni fisiologiche, la pressione venosa è molto minore rispetto a quella arteriosa, contribuendo limitatamente al CPP e al CVR. Tuttavia, specifiche condizioni patologiche frequenti nei neonati prematuri, come lo pneumotorace iperteso, possono provocare un'elevata pressione venosa. In questa condizione, il CVR diventa estremamente più grande del CPP, riducendo sensibilmente il valore di CBF e provocando di conseguenza una situazione di ischemia cerebrale [39].

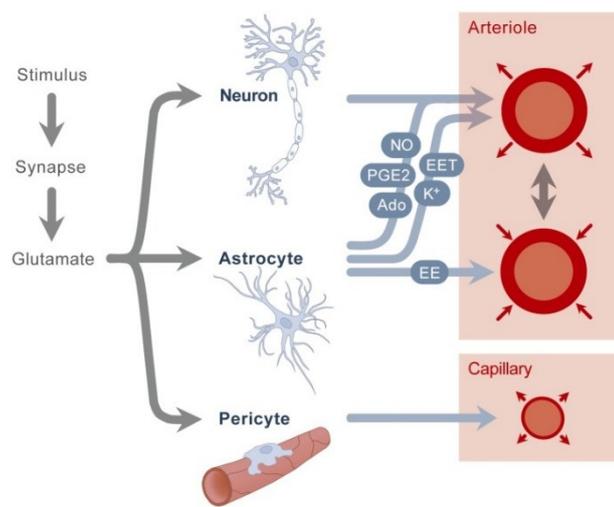


Fig. 7. Accoppiamento neurovascolare osservato a livello microscopico. In presenza di uno stimolo, la sinapsi rilascia glutammato attivando la secrezione di specifiche molecole da parte dei neuroni ed astrociti che consentono la vasodilatazione o vasocostrizione delle arteriole cerebrali. L'attivazione dei periciti provoca la vasodilatazione dei capillari. Al termine di questo processo vi è un aumento del CBF nelle regioni cerebrali ad elevata attività neurale. Preso da [40].

Definito il flusso sanguigno cerebrale, è utile descrivere brevemente il meccanismo di “accoppiamento neurovascolare”. Esso esprime la relazione diretta che vi è fra il CBF e l’attività neuronale, consentendo di mantenere un adeguato apporto di ossigeno e glucosio ai neuroni. Il rapporto tra flusso sanguigno, attività cerebrale e metabolismo è finemente regolato da segnali di natura biochimica e meccanica. A livello macroscopico l’accoppiamento neurovascolare è descritto da una forte relazione temporale e spaziale tra l’attività neurale e il flusso ematico; nelle aree cerebrali maggiormente attive vi è un significativo incremento di CBF. A livello microscopico, l’unità neurovascolare è composta da neuroni, astrociti e dal tessuto vascolare liscio (fig. 7). Il neurotrasmettitore glutammato rilasciato a seguito di un incremento dell’attività neurale induce i neuroni e gli astrociti ad attivare specifici segnali biochimici per regolare finemente la muscolatura liscia dei vasi sanguigni. Il risultato è un complesso bilanciamento tra vasodilatazione e vasocostrizione delle arteriole cerebrali che si ripercuote in un controllo diretto del flusso ematico cerebrale. Il glutammato è in grado di

rilassare i periciti, un tipo di cellula mesenchimale con funzione contrattile che circonda parzialmente la lamina basale dei capillari [40].

Alcuni studi hanno riscontrato delle differenze nella risposta emodinamica degli adulti rispetto a quella nei neonati. In condizioni fisiologiche, l'attività neurale provoca un aumento del CBF locale il quale fornisce una quantità di ossigeno significativamente superiore a quella effettivamente necessaria. Di conseguenza, la risposta emodinamica rileva un sensibile aumento della concentrazione locale di emoglobina ossigenata (HbO, proteina a cui sono legate molecole di ossigeno) e una diminuzione della corrispondente emoglobina deossigenata (HbR, proteina priva di ossigeno), essendo l'emoglobina la principale trasportatrice di ossigeno nel sangue. Tuttavia, alcuni studi di attivazione funzionale hanno dimostrato che nei neonati vi è una situazione diametralmente opposta, con un aumento dell'emoglobina deossigenata e una diminuzione della controparte ossigenata. In figura 8 sono riportati i segnali BOLD (*Blood Oxygen Level Dependent*) che quantificano la risposta emodinamica ottenuta tramite risonanza magnetica funzionale negli adulti (A) e nei neonati (B, C). Come si può notare nel riquadro C, nei neonati vi è una diminuzione di concentrazione di HbO e un aumento di HbR [41]. Risultati simili si sono ottenuti in uno studio di Arichi et al. [42], nel quale gli autori hanno confrontato la risposta emodinamica ad uno stimolo somatosensoriale in relazione all'età dei soggetti. Gli autori hanno rilevato una diminuzione del tempo di risposta e un aumento dell'ampiezza del segnale BOLD all'aumentare dell'età postnatale. I risultati ottenuti da questi due studi suggeriscono che nei neonati prematuri il consumo di ossigeno cerebrale è maggiore rispetto all'età adulta ed il relativo aumento del CBF non è in grado di soddisfare probabilmente a sufficienza le richieste metaboliche dei neuroni.

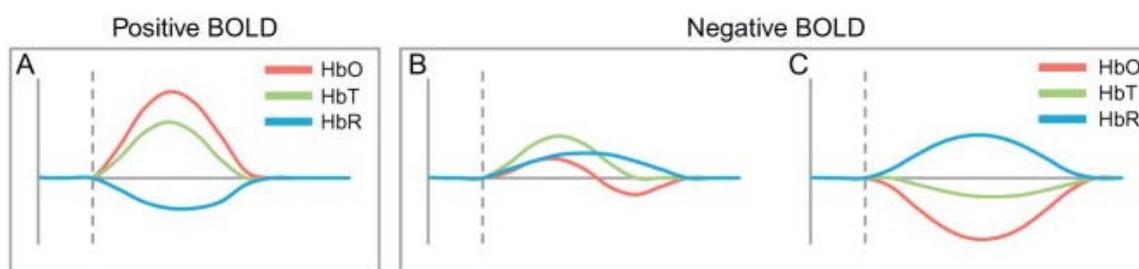


Fig. 8. Rappresentazioni delle diverse risposte emodinamiche in relazione all'età. (A) Classica risposta emodinamica di un soggetto adulto a seguito di uno stimolo. Si osserva un aumento della concentrazione di emoglobina ossigenata e una diminuzione di quella deossigenata. (B e C) Risposta emodinamica nei neonati. Si riscontra un aumento della variazione di HbR e una diminuzione di HbO. Questo risultato suggerisce un aumento della vasocostrizione che si riflette in un insufficiente apporto di ossigeno nelle aree neurali attive. Preso da [41].

Come riportato in precedenza, è ben noto che un aumento dell'attività neurale corrisponde ad una elevata richiesta di ossigeno e nutrienti la quale, in condizioni fisiologiche, viene soddisfatta da un aumento del flusso sanguigno cerebrale. È quindi interessante indagare se vi

è una relazione tra la variazione glicemica e la concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata nel cervello. A tal proposito è necessario citare una revisione sistematica della letteratura pubblicata nel 2020 da Mattersberger et al. [43], nella quale sono stati analizzati 12 studi effettuati utilizzando la spettroscopia nel vicino infrarosso per rilevare l'emodinamica cerebrale sia dei neonati prematuri che a termine. Come affermato dagli autori, i risultati ottenuti sono alquanto discordanti. In particolare, 4 pubblicazioni hanno evidenziato un'associazione negativa tra l'ossigenazione cerebrale e la concentrazione di glucosio nel sangue, 2 non hanno rilevato alcun legame mentre nelle restanti 6 non sono stati riportati i risultati della correlazione. Negli studi in cui si è osservata una correlazione negativa si è concluso che a seguito di una diminuzione della concentrazione di glucosio nel sangue vi è un aumento del volume e della concentrazione di emoglobina ossigenata a seguito di una vasodilatazione delle arteriole e dei capillari cerebrali. Questa situazione si riflette in un aumento della quantità di ossigeno apportata ai neuroni attivi, aumentando l'ossigenazione cerebrale, meccanismo che dovrebbe prevenire possibili danni cerebrali dovuti alla riduzione del glucosio.

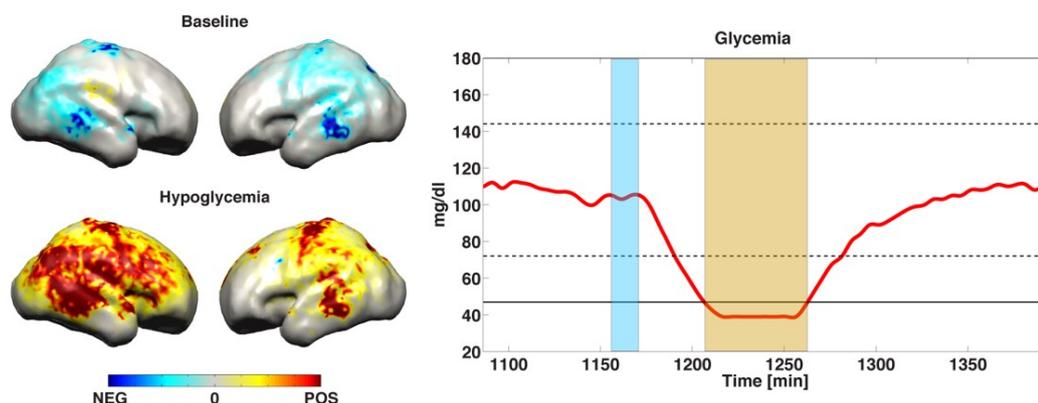


Fig. 9. Immagini DOT ricostruite in corrispondenza di un intervallo di euglicemia (in alto a sinistra) e durante un evento ipoglicemico severo (in basso a sinistra). A destra è riportato il profilo glicemico del soggetto nel quale sono state evidenziate le aree corrispondenti alle finestre temporali utilizzate per ricostruite le immagini DOT. Preso da [44].

Per quanto riguarda la popolazione di neonati prematuri è utile citare uno studio condotto da Skov e Pryds del 1992 nel quale investigarono i cambiamenti del volume sanguigno cerebrale durante un trattamento di infusione di glucosio. Gli autori hanno rilevato che a seguito di un aumento della concentrazione glicemica, il flusso ematico cerebrale decresce velocemente. Questo risultato supporta l'ipotesi della presenza di sensori del glucosio nel cervello in grado di reclutare velocemente i capillari cerebrali in situazioni di ipoglicemia per cercare di mantenere costante l'apporto di glucosio e ossigeno ai neuroni [45]. Questa ipotesi trova ulteriori conferme anche dai risultati ottenuti da uno studio preliminare condotto da Brigadoi et al. [44], nel quale è stato acquisito il profilo glicemico ed emodinamico di un neonato molto

premature per 7 giorni attraverso una combinazione di metodologie CGM-DOT (*Diffuse Optical Tomography*). Come si può osservare in figura 9, è stato rilevato un aumento della concentrazione di emoglobina totale (HbT), data dalla somma di HbO e HbR, in corrispondenza di un evento ipoglicemico severo nelle aree motorie, temporali e parietali dell'emisfero destro. Questo risultato supporta l'ipotesi che in corrispondenza di ipoglicemie nei neonati pretermine, il cervello tende a reclutare più capillari per sopperire allo scarso apporto di glucosio univocamente nelle aree interessate.

1.5 LA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO (NIRS)

Nel paragrafo precedente si è discusso l'accoppiamento neurovascolare che lega il metabolismo neuronale con le variazioni di flusso cerebrale. Uno dei metodi non invasivi più utilizzati in ambito neonatale per valutare la risposta emodinamica cerebrale è la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS). Di seguito verranno brevemente elencati i principi fisici di funzionamento e l'applicazione di questa tecnica in ambito neonatale. Per concludere verrà effettuata un'analisi dei principali vantaggi e limitazione del suo utilizzo in area clinica.

1.5.1 Principi fisici e di funzionamento

La spettroscopia nel vicino infrarosso è una tecnica che consente di monitorare il metabolismo cerebrale in maniera continua, non invasiva e con un ingombro limitato. Come il pulsiossimetro, questo strumento utilizza i principi della trasmissione e assorbimento della luce per misurare in maniera completamente non invasiva le variazioni di concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata nei tessuti cerebrali. La NIRS è composta da una serie di sorgenti luminose in grado di irradiare punti precisi dello scalpo con una luce ad una specifica intensità e lunghezza d'onda, e da rilevatori per misurare l'intensità luminosa restituita dai tessuti. L'accoppiamento sorgente-rilevatore costituisce un canale e la sua lunghezza influisce sulla profondità alla quale i fotoni possono viaggiare nei tessuti cerebrali. In particolare, l'aumento della distanza sorgente-rilevatore corrisponde ad un aumento della profondità a cui si possono effettuare le misurazioni. Tuttavia, l'intensità ottica misurata dal rilevatore decresce esponenzialmente con l'aumentare della lunghezza di un canale, facendo diminuire il rapporto segnale-rumore. Il principio fisico su cui si basa la NIRS sfrutta le proprietà basilari della propagazione della luce come l'assorbimento, dove l'energia del fotone viene ceduta al mezzo, e lo scattering, nel quale il percorso del fotone viene alterato ma l'energia viene mantenuta costante. Questi fenomeni sono direttamente proporzionali ai coefficienti di assorbimento e di scattering del materiale che, a loro volta, sono in relazione alla lunghezza d'onda a cui viene emessa la luce. Ogni sostanza presente sulla terra è caratterizzata da un preciso spettro di assorbimento. È stato dimostrato che l'emoglobina ossigenata, rispetto a quella deossigenata, assorbe meno luce nello spettro del rosso (600-750 nm) e più luce in quello infrarosso (850-1000 nm). Inoltre, l'acqua e la maggior parte degli altri tessuti cerebrali risultano trasparenti alla luce in questo intervallo di lunghezze d'onda. Di conseguenza, il sistema NIRS nella configurazione ad "onda continua" sfrutta la differenza del coefficiente di assorbimento nello spettro del vicino infrarosso delle due forme

di emoglobina per calcolare la variazione di concentrazione di HbO e HbR mediante la legge di Lambert-Beer modificata, derivata a partire dall'equazione 1.2.

$$\frac{I_{out}}{I_{in}} = e^{-x*D*\mu_a+Losses} \quad (1.2)$$

Dove I_{in} e I_{out} sono rispettivamente i valori di intensità emessi dalla sorgente e misurati dal rilevatore, x è la distanza sorgente-rilevatore, μ_a è il coefficiente di assorbimento specifico del mezzo e $Losses$ è il termine che tiene in considerazione i fotoni non misurati dal sensore a causa dello scattering e della geometria del problema. La variabile D indica il fattore differenziale di percorso (DPF) il quale rispecchia la probabilità che un fotone viaggi ad una specifica profondità nel tessuto cerebrale. Il DPF tiene in considerazione il fatto che il percorso effettuato dalla particella di luce tra la sorgente ed il rilevatore non avviene in linea retta ma bensì secondo la cosiddetta “banana shape”. Il valore del DPF è quindi in funzione delle proprietà ottiche del tessuto, che variano in base alla lunghezza d'onda e all'età del soggetto. In figura 10 si può osservare come all'aumentare della distanza sorgente-rilevatore, aumenta la sensibilità della misura agli strati cerebrali profondi ma allo stesso tempo diminuisce l'intensità di luce rilevata dal sensore. Infatti, maggiore è il percorso del fotone, maggiori sono le probabilità che esso venga assorbito dal tessuto [46].

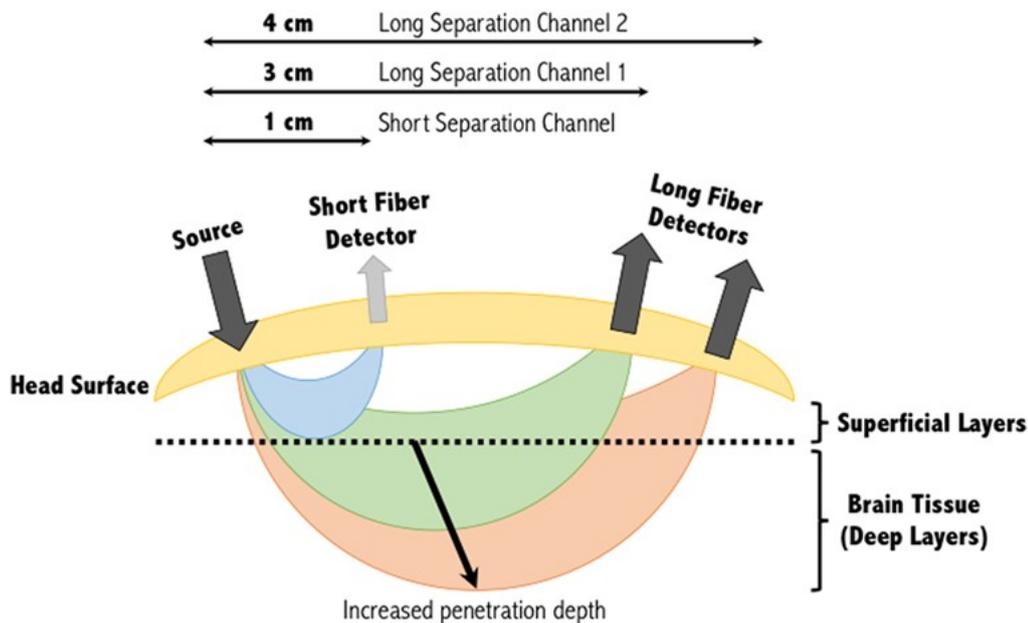


Fig. 10. Percorso caratteristico a “banana shape” dei fotoni tra sorgente e rilevatore. Si può notare che i canali a breve distanza sono sensibili solamente agli strati superficiali mentre quelli a lunga distanza consentono di rilevare l'attività metabolica cerebrale dei tessuti più profondi. Tuttavia, l'intensità rilevata in uscita da questi ultimi canali risulta attenuata. Preso da [47].

Il calcolo del coefficiente di assorbimento tramite l'inversione dell'equazione 1.2 non è possibile poiché è presente più di una incognita. Per superare questa limitazione, i sistemi NIRS ad onda continua misurano la differenza di intensità tra due istanti temporali. Sotto l'ipotesi che $Losses$, I_{in} e D non cambiano nel tempo, l'equazione può essere riscritta e semplificata come segue:

$$\ln \frac{I_2}{I_{in}} - \ln \frac{I_1}{I_{in}} = \ln \frac{I_2}{I_1} = x * D * \Delta\mu_a \quad (1.3)$$

dove I_1 ed I_2 sono i valori di intensità acquisiti in due istanti temporali diversi e $\Delta\mu_a$ è la variazione del coefficiente di assorbimento. Attraverso una semplice inversione dell'equazione 1.3 si può ottenere l'incognita $\Delta\mu_a$. La variazione del coefficiente di assorbimento ad una specifica lunghezza d'onda λ è legata linearmente ai cambiamenti nelle concentrazioni delle molecole presenti nel tessuto analizzato (moltiplicate per il loro coefficiente di assorbimento specifico $\tilde{\mu}$). Poiché con la NIRS si vogliono stimare le variazioni di concentrazione sia di HbO che di HbR, per poter effettuare questo calcolo sono necessarie misurazioni a due lunghezze d'onda impostate al di sopra ed al di sotto del punto isobestico (808 nm), cioè la lunghezza d'onda alla quale HbO ed HbR hanno lo stesso valore di assorbimento specifico (fig. 11) [46]. Si può quindi invertire facilmente la legge di Beer-Lambert modificata per ottenere la variazione di concentrazione dell'emoglobina ossigenata e deossigenata (equazione 1.4).

$$\begin{cases} \Delta\mu_a|\lambda_1 = \tilde{\mu}_{HbO|\lambda_1} \Delta C_{HbO} + \tilde{\mu}_{HbR|\lambda_1} \Delta C_{HbR} \\ \Delta\mu_a|\lambda_2 = \tilde{\mu}_{HbO|\lambda_2} \Delta C_{HbO} + \tilde{\mu}_{HbR|\lambda_2} \Delta C_{HbR} \end{cases} \quad (1.4)$$

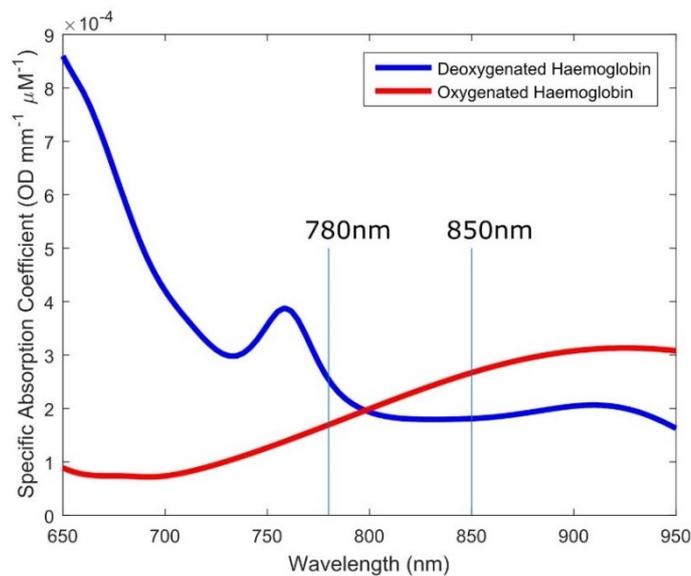


Fig. 11. Spettro di assorbimento dell'emoglobina ossigenata e deossigenata al variare della lunghezza d'onda. Il punto isobestico si trova in corrispondenza dell'intersezione delle due curve (808 nm). Le lunghezze d'onda più comunemente utilizzate dalle strumentazioni NIRS sono 780 nm e 850 nm. Preso da: <https://www.gowerlabs.co.uk/fnirs>.

1.5.2 Applicazioni in ambito neonatale

La spettroscopia nel vicino infrarosso è una tecnica totalmente non invasiva a minimo ingombro che consente di monitorare in maniera continua l'attività cerebrale. Non richiedendo particolari accortezze da parte del paziente, questa tecnologia può essere utilizzata anche nei bambini e neonati. Verranno ora riportati alcuni esempi riguardanti l'applicazione della NIRS in ambito neonatale sia clinico che scientifico.

Il monitoraggio tramite NIRS può giocare un ruolo fondamentale nella stabilizzazione dei neonati prematuri nei primi giorni di vita, cercando di prevenire la comparsa di lesioni cerebrali. In particolare, si è registrato un aumento nel suo utilizzo in terapia intensiva neonatale per monitorare in maniera continua l'ossigenazione dei tessuti cerebrali. L'autoregolazione cerebrale descrive l'abilità di mantenere costante il flusso sanguigno cerebrale in risposta a variazioni della pressione di perfusione encefalica. È stato dimostrato che nei neonati prematuri questa abilità è compromessa. La combinazione tra la NIRS ed il monitoraggio della pressione arteriosa consente di ottenere uno strumento di valutazione continuo e dinamico dell'autoregolazione cerebrale direttamente al letto del paziente. Di conseguenza, si possono rilevare in tempo reale eventuali alterazioni della perfusione cerebrale e iniziare tempestivamente delle contromisure per aumentare, diminuire o mantenere costante il flusso sanguigno cerebrale. In questo modo si può limitare la comparsa di lesioni cerebrali come l'emorragia intraventricolare o la leucomalacia periventricolare [48].

L'utilizzo della spettroscopia nel vicino infrarosso funzionale (fNIRS) consente di analizzare la connettività cerebrale e le funzioni neurologiche sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Si può quindi studiare l'attivazione di precise aree del cervello a seguito di specifici *task* o in condizioni di riposo. In letteratura sono presenti numerosi studi nei quali si utilizza la fNIRS per valutare la risposta cerebrale neonatale a stimoli di natura olfattiva, visiva, sensoriale e tattile [49]–[53]. Uno degli obiettivi di questi studi è provare a identificare e diagnosticare preventivamente eventuali deficit cognitivi. Poiché la NIRS consente al paziente di effettuare dei piccoli movimenti, si può utilizzare questa tecnica per valutare l'interazione dei neonati con l'ambiente circostante durante i processi di apprendimento. In uno studio condotto da Vannasing et al. [54] è stata utilizzata la fNIRS per valutare se vi sono differenze nei network neurali attivati durante *task* di natura linguistica e non linguistica in neonati di appena un giorno di vita. Tramite un confronto tra il segnale di emoglobina ossigenata rilevato nei due emisferi temporali si è riscontrato che vi è una lateralizzazione dell'attivazione cerebrale se lo stimolo è fornito nella lingua nativa del neonato. In particolare, si è rilevata

l'attivazione dell'emisfero destro per stimoli in lingua nativa mentre predomina quello sinistro in risposta ad uno stimolo in lingua non nativa. Inoltre, si sono riscontrate attivazioni cerebrali bilaterali a seguito di stimoli non linguistici. In conclusione, questo studio ha dimostrato che la specializzazione dell'emisfero sinistro risulta essere già sviluppata nelle prime 24 ore di vita.

Tramite l'utilizzo della fNIRS si possono effettuare anche degli studi di connettività funzionale in "*resting-state*" nei quali si valuta la correlazione temporale tra i segnali relativi alla concentrazione di emoglobina ossigenata/deossigenata di diverse aree cerebrali in condizioni di riposo, cioè senza la presenza di uno stimolo esterno. Uno studio di particolare interesse è stato condotto da Uchitel et al. [55] per valutare se le diverse fasi del sonno possono influire sull'attivazione cerebrale a riposo dei neonati. La peculiarità di questo studio consiste nell'aver utilizzato per la prima volta un'apparecchiatura NIRS wireless indossabile in ambito neonatale. La popolazione analizzata è composta da 45 neonati ai quali è stata effettuata l'acquisizione NIRS direttamente in culla durante la loro degenza ospedaliera post-parto. La classificazione delle diverse fasi del sonno è stata possibile attraverso l'analisi di un filmato ottenuto contemporaneamente alla rilevazione NIRS. È stato dimostrato che vi è una maggiore connessione interemisferica durante la fase di sonno attivo (AS) mentre vi è una forte connessione locale a corto raggio durante la fase di sonno tranquillo (QS). In diversi studi animali si è rilevato che il flusso sanguigno cerebrale, l'apporto di ossigeno e il consumo metabolico è maggiore durante la fase AS piuttosto che in quella QS. L'aumento della forza nella connessione interemisferica rilevata nello studio di Uchitel durante il sonno attivo suggerisce che questa fase può essere funzionalmente importante nello sviluppo delle connessioni interemisferiche.

Per concludere, è importante riportare il ruolo fondamentale dell'utilizzo della NIRS in studi di farmacodinamica. Un trial clinico condotto da Pellicer et al. [56] ha valutato l'effetto della dopamina (DP) e delle epinefrine (EP) per il trattamento dell'ipotensione sistemica in un gruppo di neonati pretermine. È stato rilevato che una dose medio-bassa di DP o bassa di EP causa un aumento della perfusione cerebrale con conseguente incremento della pressione sanguigna media. In uno studio svolto da Wong et al. [57] è stata riscontrata una relazione tra perfusione cerebrale e metabolismo dell'ossigeno tipica di un cervello maturo in neonati prematuri sottoposti ad una terapia farmacologica per l'ipotensione che stimola la produzione di dopamina.

1.5.3 Vantaggi e limitazioni nell'utilizzo della NIRS in ambiente clinico

In questo paragrafo verranno elencati i maggiori vantaggi e limitazioni dell'utilizzo della NIRS in ambiente clinico rispetto alla risonanza magnetica funzionale (fMRI).

La risonanza magnetica funzionale è una tecnica di *imaging* che consente di valutare l'attivazione cerebrale tramite la misurazione del segnale BOLD generato da variazioni locali nella concentrazione di emoglobina deossigenata, l'unica conformazione con proprietà paramagnetiche. Data la sua elevata risoluzione spaziale è considerata il *gold standard* negli studi di attivazione cerebrale. Tuttavia, la fMRI è caratterizzata da pesanti limitazioni. Ad esempio, lo spazio ristretto dello scanner non consente di effettuare acquisizioni durante task complessi, il rumore emesso dalla strumentazione riduce notevolmente il confort del soggetto, è caratterizzata da una bassa risoluzione temporale che si ripercuote su un aumento della durata dell'esame ed è contraddistinta da costi di mantenimento particolarmente elevati. La limitazione principale della fMRI risiede nella sua elevata suscettibilità ad artefatti da movimento. Per ottenere immagini accurate e prive di sfuocature, il soggetto all'interno dello scanner deve limitare il più possibile anche i più piccoli spostamenti della testa durante l'intera acquisizione del segnale. Sebbene negli adulti questo problema può essere facilmente risolto istruendo il paziente a limitare i movimenti, in una popolazione di bambini e neonati questo approccio risulta impossibile. Si dovrà ricorrere inevitabilmente alla sedazione del soggetto, aumentando sensibilmente i rischi per la salute e rendendo irrealizzabili gli studi di attivazione cerebrale in risposta a stimoli precisi, oppure ad un training del soggetto che deve essere abituato a dormire in un ambiente rumoroso e scomodo come lo scanner. Anche i risultati ottenuti in condizione di "*resting state*" possono essere compromessi dagli artefatti da movimento e contaminati [58].

Alcune delle limitazioni che caratterizzano le acquisizioni fMRI possono essere risolte tramite l'utilizzo della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso, la quale consente di ottenere un segnale simile al BOLD mettendo in relazione i cambiamenti locali di emoglobina deossigenata con le alterazioni del volume sanguigno cerebrale. Le caratteristiche di non invasività, portabilità e ripetibilità consentono alla fNIRS di essere uno strumento fondamentale nella rilevazione dell'attività cerebrale negli adulti e, soprattutto, nei bambini e neonati. Questa tecnologia è silenziosa e non necessita di una marcata soppressione dei movimenti del soggetto. La presenza di efficienti algoritmi di correzione degli artefatti da movimento garantisce una maggiore libertà durante l'acquisizione, evitando la sedazione e mantenendo il paziente vigile per l'intera durata dell'acquisizione. In questo modo è possibile utilizzare la NIRS in studi di

attivazione cerebrale sia in risposta a precisi stimoli che in condizioni di riposo. Si possono utilizzare paradigmi sperimentali non compatibili con la strumentazione MRI, valutando l'interazione del soggetto con l'ambiente circostante come, ad esempio, le reazioni cerebrali nella comunicazione faccia a faccia, nell'interazione madre-figlio o durante l'attività lavorativa e fisica (fig. 12) [53].



Fig. 12. Esempi di utilizzo della fNIRS. In relazione al grado di libertà richiesto dal task, si può utilizzare un dispositivo in configurazione cablata o wireless. La realizzazione di questa tipologia di studi sull'attivazione cerebrale non può essere effettuata tramite risonanza magnetica funzionale. Preso da <https://www.mdpi.com/2304-6732/6/3/87>.

La spettroscopia nel vicino infrarosso ha una maggiore risoluzione temporale, la frequenza di campionamento è tipicamente di 10 Hz ma in determinate configurazioni può raggiungere una frequenza di campionamento di 100 Hz. L'acquisizione del segnale NIRS risulta essere molto più veloce rispetto al tempo necessario per ottenere immagini MRI. In ambito neonatale si è registrata una maggiore propensione ad avvalersi della fNIRS quando possibile. La strumentazione non utilizza radiazioni ionizzate e di conseguenza non risulta dannosa per i neonati. La possibilità di usare dispositivi indossabili, miniaturizzati e wireless aumenta il confort del bambino e può essere utilizzata anche per periodi di acquisizione prolungati. Inoltre, non è sensibile ad interferenze di natura elettromagnetica e quindi risulta essere compatibile con altre apparecchiature biomedicali. L'utilizzo di *setting* ad alta densità con un numero elevato di sorgenti e rilevatori, il loro posizionamento e le fibre ottiche utilizzate per trasmettere i dati non causano dolore o abrasioni nella delicata pelle del neonato [59]. Un altro aspetto di fondamentale importanza nell'utilizzo della NIRS consiste nel suo limitato tempo di *setup*. Il medico o infermiere, infatti, in pochi minuti è in grado di preparare il paziente e di ottenere delle misure direttamente a bordo-culla (fig. 13). In questo modo si possono effettuare facilmente un numero elevato di acquisizioni in qualsiasi condizione clinica. Inoltre, poiché i neonati sono caratterizzati da uno scalpo sottile con pochi capelli, i fotoni emessi dalla NIRS sono in grado di penetrare agilmente nel cervello ottenendo misurazioni relative a tessuti cerebrali a diverse profondità [53].

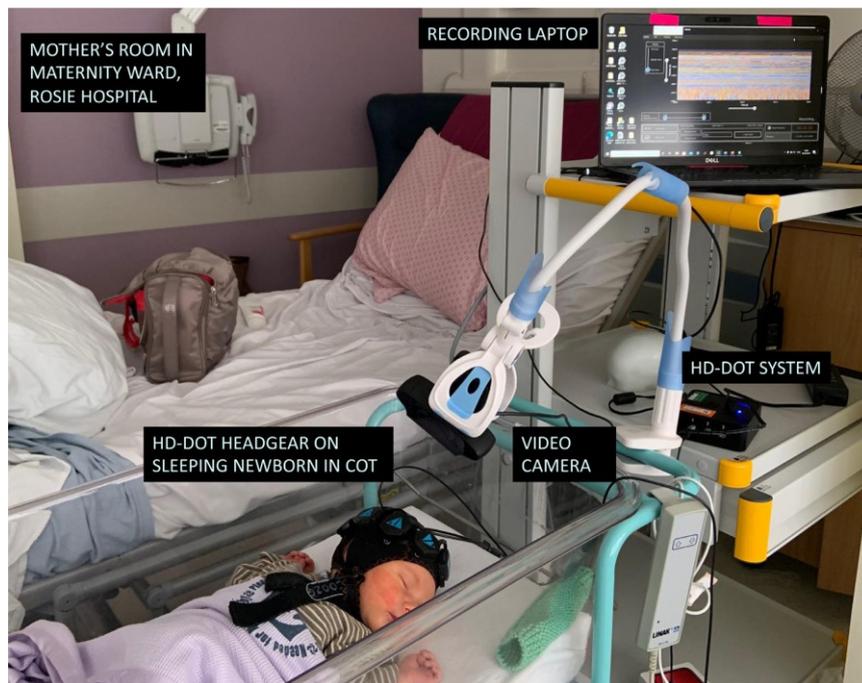


Fig. 13. Esempio di setup sperimentale. In questo studio è stata utilizzata una cuffia wireless che consente la piena libertà di movimento al neonato. Questa configurazione permette di rilevare l'attività cerebrale del soggetto direttamente a bordo-culla nel reparto di maternità durante la naturale degenza post-parto. Si può osservare la semplicità del setup che richiede pochi minuti per rendere operativa l'acquisizione. Preso da [55].

Nonostante i numerosi vantaggi soprariportati, la spettroscopia nel vicino infrarosso è caratterizzata anche da alcune limitazioni degne di nota. I metodi di *imaging* ottico consentono di ottenere una risoluzione spaziale di 2-3 cm, sensibilmente peggiore rispetto a quella garantita dalla fMRI, la quale consente di ottenere una precisione massima di 0.3 cm. Inoltre, poiché la fNIRS non fornisce alcuna informazione anatomica relativa al paziente sotto esame, è necessario registrare l'attività cerebrale su un modello anatomico opportunamente selezionato. In letteratura sono presenti numerosi atlanti per la popolazione adulta, ottenuti tramite la media di numerose scansioni MRI. Viceversa, la scelta di un appropriato modello anatomico neonatale risulta critica data l'estrema velocità dello sviluppo cerebrale e la difficoltà nell'ottenere immagini MRI in questa popolazione. La selezione deve avvenire, quando possibile, sulla base dell'età gestazionale del neonato. L'utilizzo di un atlante personalizzato non è possibile in quanto se si sottoponesse il paziente ad una scansione di risonanza magnetica si perderebbero tutti i vantaggi introdotti dall'utilizzo della NIRS. Un'altra limitazione della spettroscopia nel vicino infrarosso consiste nel discriminare in maniera efficace il segnale relativo alla risposta cerebrale da tutte le componenti che lo caratterizzano. Si deve ricordare che l'acquisizione NIRS avviene a livello dello scalpo e che quindi i fotoni emessi dalla sorgente devono attraversare alcuni tessuti extracerebrali altamente vascolarizzati prima di raggiungere la corteccia cerebrale. Di conseguenza il segnale acquisito dal rilevatore è composto non solo dalla risposta cerebrale ma anche da componenti extracerebrali (scalpo e cranio) e sistemiche (onde

vasomotorie, pulsazione cardiaca e frequenza respiratoria), oltre al rumore additivo di misura (fig. 14). Per poter effettuare una corretta interpretazione del segnale e ottenere delle stime precise dell'attività cerebrale tramite NIRS è di fondamentale importanza adottare opportune strategie per eliminare gli effetti dell'interferenza fisiologica. Nel neonato, data lo spessore molto limitato di scalpo e cranio, e la ridotta dimensione della testa, nonché la ridotta presenza di capelli, il contributo sistemico degli strati extra cerebrali è molto ridotto. Inoltre, nel neonato, i canali NIRS solitamente hanno una sensibilità a misurare il segnale cerebrale molto più alta (più del doppio) rispetto a quella presente negli adulti, rendendo quindi la presenza di rumore fisiologico meno problematica che in popolazioni adulte o pediatriche [60]. Un'altra componente che può corrompere il segnale NIRS utile deriva dagli artefatti da movimento. Sebbene la NIRS consenta una maggiore libertà rispetto alla MRI, eccessivi movimenti della testa possono compromettere il corretto accoppiamento sensore-scalpo introducendo alterazioni non fisiologiche del segnale. Questa limitazione è più marcata nella popolazione pediatrica neonatale in quanto non è possibile istruire adeguatamente il soggetto a non effettuare movimenti indesiderati del capo. In letteratura vi sono numerosi algoritmi da poter utilizzare per correggere gli artefatti da movimento; tuttavia, la bontà del risultato ottenuto è strettamente legata alla corretta scelta della metodologia di correzione [53].

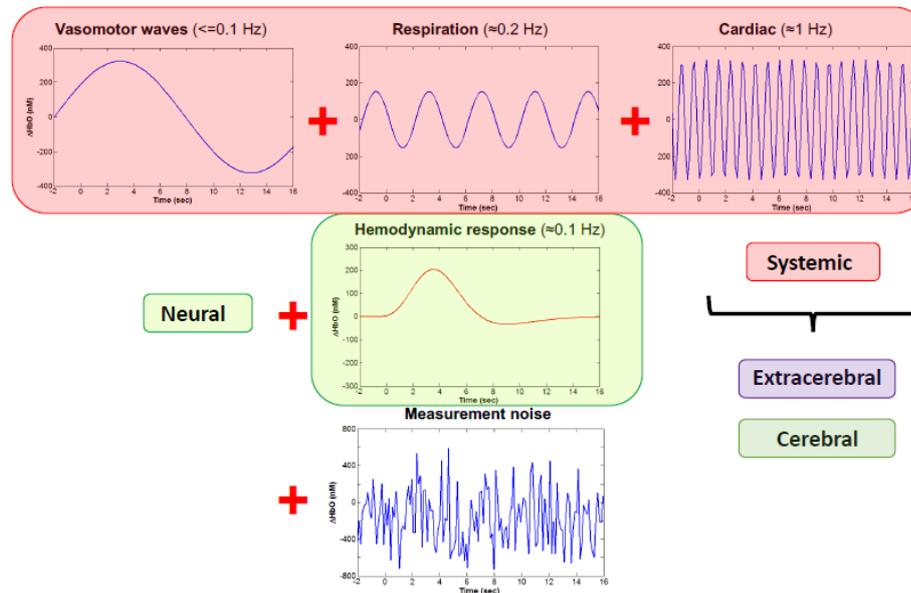


Fig. 14. Composizione del segnale NIRS. Oltre alla risposta emodinamica di interesse prodotta dall'attivazione neurale, la strumentazione rileva anche l'errore di misura e le componenti sistemiche relative alle onde vasomotorie, alla respirazione e al battito cardiaco. Preso da [61].

1.6 *RESTING STATE FUNCTIONAL CONNECTIVITY*

Prima di procedere alla descrizione dello scopo della tesi è utile effettuare una breve analisi della letteratura in riferimento alla *Resting State Functional Connectivity* (rsFC), esplorandone il suo possibile utilizzo in ambiente clinico come biomarcatore per alcuni disturbi del neurosviluppo.

Gli esperimenti di rsFC consistono nell'acquisizione dell'attivazione cerebrale spontanea dei pazienti ai quali è richiesto di rimanere in uno stato rilassato, vigile e possibilmente di non pensare a niente di particolare. L'assenza di specifici *task* da eseguire rende questa tipologia di studi facilmente realizzabile in quasi tutte le tipologie di pazienti. Infatti, è molto utilizzata in popolazioni con patologie neurologiche, neurochirurgiche e psichiatriche; nonché con bambini i quali fanno fatica a seguire eventuali istruzioni o eseguire *task* specifici [62]. La connettività funzionale, che può essere definita come la coordinazione di attività neurali in diverse zone cerebrali, è molto spesso stimata come correlazioni temporali di oscillazioni a basse frequenze (0.01 – 0.10 Hz) del segnale BOLD tra aree anatomicamente separate dell'encefalo. Si è osservato che in condizioni di *resting state* le diverse regioni cerebrali sono connesse funzionalmente attraverso dei specifici e ricorrenti pattern di attivazione, i quali costituiscono un'organizzazione intrinseca dell'attività cerebrale chiamata *Resting State Networks* (RSN). Alcuni ricercatori hanno dimostrato che questi RSN sono presenti anche durante l'esecuzione di specifici *task*; tuttavia, in queste condizioni la loro attivazione può essere fortemente ridotta e rilevabile solamente in sottofondo. Cambiamenti dei RSN possono essere osservati anche chiedendo semplicemente al paziente di effettuare la scansione a riposo con gli occhi aperti o chiusi. Attraverso l'uso di diverse tecniche di *imaging* cerebrale si possono definire i vari RSN come, ad esempio, il *motor network* (coinvolto nella pianificazione ed esecuzione del movimento) o il *default mode network* (predominante in condizione di totale riposo cerebrale). Durante il *resting state* l'attività cerebrale spontanea corrisponde alla maggior parte del segnale rilevato e consente quindi di fornire informazioni importanti per descrivere le funzioni cerebrali. Inoltre, l'assenza di *task* specifici consente di ottenere risultati confrontabili tra diverse popolazioni in quanto non si introduce variabilità dovuta all'abilità di comprensione del compito da svolgere o del livello di attenzione del paziente. Inoltre, non essendoci un protocollo di acquisizione specifico da utilizzare, si possono ottenere risultati confrontabili tra studi effettuati in centri diversi [63].

Verranno ora riportati alcuni studi nei quali si è valutato l'utilizzo della rsFC nei neonati per identificare cambiamenti nei RSN che suggeriscono l'utilizzo di questi parametri come potenziali biomarcatori per alterazioni del neurosviluppo.

In uno studio condotto da Batalle et al. [64] è stata applicata l'analisi rsFC in una popolazione di neonati a termine nei quali è stato diagnostico un ritardo della crescita intrauterina (IUGR) per valutare se cambiamenti della connettività cerebrale a riposo possono prevedere future alterazioni del neurosviluppo del bambino. In particolare, sono stati acquisiti 20 neonati con IUGR e 13 pazienti di controllo, i quali sono stati sottoposti a scansioni di fMRI. I network funzionali sono stati identificati sulla base della correlazione di segnali BOLD tra 90 regioni di interesse poste sulla materia grigia ed estratte tramite un atlante anatomico. È stata applicata la teoria dei grafi per estrarre alcune metriche in grado di riassumere l'organizzazione e l'infrastruttura dei RSN identificati. Al termine dello studio, nei pazienti IUGR si è rilevato un aumento significativo delle connessioni cerebrali in una organizzazione subottimale dei network cerebrali coinvolti. Un'ulteriore analisi ha riscontrato alterazioni di *features* che identificano i RSN nella corteccia frontale, cingolata e nel giro linguale. È noto che l'identificazione di IUGR può essere un fattore di rischio per disordini dello sviluppo come il disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD), disturbi nello spettro dell'autismo e schizofrenia. Gli autori hanno quindi ipotizzato che i collegamenti tra IUGR e disturbi del neurosviluppo possono essere parzialmente associati a disfunzioni in specifici sub-network regionali causati da una riorganizzazione cerebrale. Questa ipotesi è supportata dalla rilevazione di una significativa associazione tra le alterazioni dei network e i punteggi ottenuti in diversi test neurocomportamentali. In definitiva, i risultati ottenuti da questo studio dimostrano la capacità dei RSN di caratterizzare la riorganizzazione cerebrale fin dai primi giorni di vita e di essere un potenziale biomarcatore per identificare precocemente delle alterazioni nel neurosviluppo.

In una revisione della letteratura effettuata da Heunis et al. [65] si sono valutati tre nuovi biomarcatori basati sull'analisi del segnale elettroencefalografico (EEG) per: identificare precocemente il rischio di sviluppare il disturbo dello spettro autistico (ASD), per classificare i pazienti in sottogruppi clinicamente rilevanti e per monitorare gli esiti delle diverse strategie di intervento applicate. Il primo biomarcatore proposto è l'entropia, cioè una misura in grado di riassumere l'irregolarità del segnale EEG. È stato rilevato che tale parametro diminuisce negli infanti ad elevato rischio di ASD rispetto al valore che caratterizza la popolazione non patologica di controllo (sviluppo tipico, TD). Sono stati valutati anche biomarcatori derivati dall'analisi di rsFC. Nei pazienti ASD, rispetto a TD, si è rilevato un valore ridotto di coerenza

calcolato tra segnali appartenenti ad elettrodi EEG a breve distanza mentre vi è un aumento del medesimo parametro in quelli posizionati a lunga distanza. Il terzo ed ultimo biomarcatore citato deriva da una analisi di ricorrenza, la quale tiene conto della natura complessa, non lineare e dinamica dell'attività cerebrale. Alcuni parametri estratti da questo processo consentono di classificare con una buona precisione i segnali EEG dei pazienti per identificare in maniera precoce la predisposizione all'ASD o al TD. I tre potenziali biomarcatori appena descritti, di cui uno basato sull'analisi della rsFC, suggeriscono che è possibile effettuare processi di screening per identificare la propensione verso lo sviluppo di disturbi dello spettro autistico ma anche di svolgere una classificazione diagnostica per attivare precocemente le terapie del caso. Nonostante ciò, sono necessari ulteriori studi per indagare le migliori strategie di *preprocessing* e di estrazione analitica di tali parametri dal segnale per evitare la presenza di *confounders* all'interno dell'analisi, come ad esempio età, sesso, quoziente intellettivo, comorbidità o influenza da farmaci.

Uno studio condotto da Rosemberg et al. [66] ha proposto un nuovo biomarcatore basato sulla connettività cerebrale a riposo, rilevata tramite fMRI, per valutare il livello di “attenzione sostenuta” dei pazienti. Gli autori hanno sviluppato un modello *data-driven* in grado di prevedere il comportamento dei pazienti nei vari test standard utilizzati per valutare la loro abilità di attenzione sostenuta. In particolare, tramite l'analisi della rsFC è stato individuato un nuovo network denominato *Sustained Attention Network* (SAN). L'algoritmo, che si basa sull'analisi del SAN, è in grado non solo di prevedere il risultato di un test sull'attenzione ma anche di valutarla sulla base della sua attivazione in condizioni di riposo. Per dimostrare la completa adattabilità di questo biomarcatore, gli autori hanno verificato che esso è in grado di effettuare una diagnosi di ADHD dalla sola scansione fMRI a riposo in bambini e adolescenti rilevati in più centri di ricerca. La possibilità di acquisire informazioni dall'intero cervello in condizioni di riposo, in breve tempo e non valutando solamente la risposta localizzata in base al task eseguito, consente di ottenere risultati standardizzabili e riproducibili in qualsiasi parte del mondo. Inoltre, poiché l'analisi viene effettuata in una condizione di riposo, questo biomarcatore è indicato anche in popolazioni che per svariati motivi non riescono a compiere specifici task, restituendo risultati *unbiased* da poter utilizzare anche per valutare l'attenzione in studi longitudinali senza che essi dipendano dal risultato di una performance del paziente ad uno specifico *task*. I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che la connettività funzionale cerebrale a riposo è un biomarcatore robusto per valutare l'abilità di “attenzione sostenuta”.

Gli studi riportati sembrano sostenere l'ipotesi che la connettività cerebrale a riposo possa essere utilizzata come biomarcatore per valutare numerosi aspetti legati al neurosviluppo e alla comparsa di eventuali deficit. È utile sottolineare che alla data di pubblicazione di questa tesi non sono presenti in letteratura pubblicazioni che analizzano la dipendenza tra glicemia e alterazione della risposta emodinamica o della connettività cerebrale. Tuttavia, alla luce di quanto emerso fino ad ora si può ragionevolmente ipotizzare che se vi è effettivamente una relazione tra variabilità glicemica ed emodinamica cerebrale, gli eventi glicemici sperimentati all'interno di un intervallo temporale possono influire e riflettersi in alterazioni della rsFC rilevata tra il punto iniziale e finale dell'acquisizione.

1.7 SCOPO DELLA TESI

Lo sviluppo di nuove tecnologie mininvasive di rilevazione del glucosio e dell'emodinamica cerebrale permette di effettuare un'ampia gamma di nuovi studi non solo sugli adulti, ma soprattutto su popolazioni estremamente critiche come quella dei neonati prematuri. In particolare, i sensori CGM di ultima generazione consentono di effettuare un'acquisizione continua dei valori del glucosio e di tracciare un accurato e preciso profilo glicemico dei pazienti. Sebbene il suo utilizzo in ambito clinico neonatale debba essere ancora validato, alcuni studi in letteratura lo identificano come un promettente strumento semplice da utilizzare ed applicare, in grado di restituire misurazioni precise senza dover effettuare continui prelievi di sangue o stick glicemici che possono causare un notevole stress e dolore fisico al neonato.

Allo stesso modo, l'utilizzo della spettroscopia nel vicino infrarosso sta subendo un notevole incremento del suo utilizzo in ambito neonatale per effettuare studi sull'emodinamica cerebrale. Fino a non poco tempo fa, l'unico strumento in grado di effettuare questa tipologia di analisi era la risonanza magnetica. Tuttavia, le notevoli limitazioni in termini di tempo e spazio rendono questa tecnologia molto difficile da utilizzare in popolazioni pediatriche e neonatali. Per evitare artefatti da movimento e per rendere questa procedura tollerabile, in questa tipologia di pazienti, si deve inevitabilmente ricorrere alla sedazione. In questo modo gli studi di attivazione cerebrale in relazione a specifici task sono fortemente compromessi e anche la valutazione dell'emodinamica cerebrale in condizioni di riposo può essere alterata dall'anestesia. L'utilizzo della NIRS consente di ottenere risultati simili in maniera completamente non invasiva, aumentando la risoluzione temporale e ampliando gli orizzonti della ricerca. D'altro canto, questa tecnologia è ancora caratterizzata da alcune limitazioni come, ad esempio, la bassa risoluzione spaziale, la mancanza di informazioni anatomiche e l'assenza di algoritmi standard in grado di ottenere risultati riproducibili. Tuttavia, la presenza in letteratura di alcuni atlanti anatomici neonatali, classificati in base all'età gestazionale anche per neonati prematuri, consente di ottenere buoni risultati in quanto si possono tenere in considerazione le differenze morfologiche che caratterizzano i pazienti a diverse settimane di gestazione.

Questa tesi si sviluppa all'interno del progetto "*BabyGlucoLight*", sviluppato da una collaborazione tra il dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione e il dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova. All'interno di questo progetto si sono acquisiti dati di natura glicemica e di emodinamica cerebrale, attraverso l'uso del sensore CGM e della NIRS, in una popolazione di 47 neonati molto prematuri durante

la prima settimana di vita in terapia intensiva neonatale. Alla data di pubblicazione di questa tesi, il database a disposizione risulta essere unico nel suo genere e consente di effettuare una nuova ampia gamma di studi per indagare la relazione tra variabilità glicemica ed emodinamica cerebrale nella popolazione neonatale prematura.

Nonostante la carenza di studi a riguardo, i neonati prematuri sembrano essere caratterizzati da una estrema variabilità glicemica che si presenta nei primi giorni di vita. Alcune indagini svolte hanno rivelato che questi eventi glicemici ricorrenti sembrano essere causati da un'alterazione del metabolismo del glucosio dovuto ad un mancato sviluppo completo del feto. Per garantire un corretto funzionamento cerebrale i neuroni hanno bisogno di un costante apporto di ossigeno, nutrienti e glucosio. In letteratura alcuni studi hanno rilevato una possibile relazione tra le alterazioni di glucosio e la presenza di lesioni cerebrali. Tuttavia, alla data di pubblicazione di questa tesi non sono note pubblicazioni scientifiche che valutano la relazione tra glicemia ed emodinamica cerebrale in neonati prematuri. A tal proposito lo scopo principale di questa tesi consiste nell'indagare una possibile relazione tra la variabilità glicemica, rilevata tramite sensore CGM, ed alterazioni della connettività cerebrale a riposo, calcolata tramite analisi NIRS, nei primi giorni di vita in neonati prematuri. Dal dataset in nostro possesso, si sono estratte alcune metriche relative alla glicemia dei pazienti e si è calcolata la differenza della matrice di connettività cerebrale derivata in due intervalli di euglicemia, all'inizio e alla fine dell'acquisizione. Questi valori sono stati utilizzati per valutare se l'instabilità glicemica sperimentata dai neonati prematuri ha modificato la connettività cerebrale a riposo nella popolazione analizzata. Avendo a disposizione un database unico nel suo genere con una discreta mole di dati, si è deciso di effettuare alcune indagini secondarie. In particolare, si è effettuata un'analisi glicemica di tutti i pazienti all'interno del dataset per valutare l'incidenza degli eventi glicemici in una popolazione neonatale prematura. Inoltre, non essendoci un approccio standard per effettuare il *preprocessing* dei segnali NIRS, sono stati esaminati alcuni algoritmi presenti in letteratura con lo scopo di identificare un metodo per ottenere risultati riproducibili. Infine, sono state effettuate delle considerazioni sulle matrici di rsFC valutando qualitativamente se vi sono delle differenze tra i due istanti temporali analizzati.

Data l'estrema mancanza di studi sulla prematurità e sulle variazioni glicemiche ed emodinamiche che avvengono nei primi giorni di vita, questa tesi ha lo scopo di fornire alcuni risultati esplorativi che potrebbero essere utili in future indagini sull'argomento e per valutare l'impatto a breve e a lungo termine delle fluttuazioni glicemiche neonatali. In questo modo si potranno poi valutare le terapie migliori per correggere questi comportamenti e garantire un adeguato sviluppo neurologico del bambino.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

In questo capitolo verranno descritti i procedimenti e i metodi statistici utilizzati per indagare la presenza di una relazione tra la variabilità glicemica e le alterazioni della connettività cerebrale a riposo in neonati molto prematuri. A tal proposito, dopo aver effettuato l'analisi dei tracciati del glucosio per ciascun paziente, si estrarranno alcune metriche in grado di descriverne la variabilità. Per valutare l'alterazione della connettività cerebrale verranno individuate nel segnale NIRS le due migliori finestre da cinque minuti rispettivamente all'interno del primo ed ultimo intervallo di euglicemia. In queste due porzioni di segnale, dopo una fase di *preprocessing*, verrà risolto il problema inverso e saranno ricostruite le immagini DOT contenenti i valori di concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata mappati sulla corteccia cerebrale. Al termine dell'analisi della connettività funzionale a riposo, ottenuta con la metodologia *seed based*, verranno calcolate le matrici di connettività per ciascuna delle forme di emoglobina nei due intervalli in analisi. Effettuando una semplice sottrazione tra questi due valori si otterranno delle metriche in grado di rappresentare le variazioni in rsFC tra inizio e fine monitoraggio che andranno valutate in relazione alle fluttuazioni glicemiche.

2.1 DESCRIZIONE DEL DATASET

Il dataset consiste in una combinazione di dati glicemici e di emodinamica cerebrale acquisiti in neonati prematuri durante la prima settimana di vita in regime di ricovero presso la terapia intensiva neonatale dell'Azienda Ospedale Università di Padova. Il dataset fa parte del progetto "*BabyGlucoLight*", finanziato dal Ministero della Sanità con il bando di Ricerca Sanitaria Finalizzata 2019, che coinvolge il Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione e il Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università degli studi di Padova e ha lo scopo di valutare l'impatto clinico dell'utilizzo di un sensore a monitoraggio continuo del glucosio per gestire la variabilità glicemica e di conseguenza

l'emodinamica cerebrale del neonato; inoltre, ha l'obiettivo di investigare se le variazioni glicemiche e la risposta emodinamica cerebrale che avvengono nei primi giorni di vita in neonati molto prematuri possono riflettersi su future alterazioni del loro neurosviluppo [67].

L'arruolamento dei pazienti è iniziato a marzo 2020 ed è terminato a giugno 2023. Un paziente viene selezionato per lo studio se è nato prima delle 32 settimane di gestazione e se il peso alla nascita è inferiore a 1500 g. Tuttavia, ad inizio studio si sono riscontrate numerose difficoltà nella fase di reclutamento a causa della propagazione della pandemia da COVID-19. Per questo motivo si è deciso di introdurre nello studio anche pazienti che soddisfano un solo criterio tra quelli sopraccitati. Un esempio è il paziente 19 il quale è stato selezionato per il peso alla nascita di 690 g nonostante sia nato alla 35+1 settimana di gestazione e il paziente 07, nato alla 30+5 settimana di gestazione ma con un peso alla nascita di 2390 g. Poiché il sensore di monitoraggio continuo del glucosio deve essere inserito entro 48 ore dalla nascita e deve avvenire in concomitanza con l'applicazione del caschetto NIRS, l'eventuale assenza in questo arco temporale del personale medico qualificato designato all'acquisizione dati o della strumentazione necessaria, comporta l'esclusione del paziente dallo studio anche se inizialmente arruolabile. Inoltre, sono stati selezionati solamente neonati che al momento della nascita non hanno presentato sintomi di ulteriori patologie, come ischemia, ipossia o alterazioni cromosomiche, in quanto potrebbero compromettere i dati relativi all'emodinamica cerebrale. La comparsa di condizioni mediche successive al termine dell'acquisizione dei dati, come ad esempio diagnosi di autismo o emorragie cerebrali, non sono significative al fine del mio studio ma devono essere tenute in considerazione all'interno del progetto "*BabyGlucLight*" in quanto possono incidere nello sviluppo neurologico del bambino.

A marzo 2023, data di inizio di questo lavoro di tesi, i soggetti arruolati allo studio sono 55, di questi però solamente 47 fanno parte del dataset analizzato in quanto hanno a disposizione dati CGM e NIRS correttamente acquisiti. L'esclusione a posteriori di 8 soggetti è stata necessaria a seguito di alcune complicazioni manifestate dal neonato che non hanno consentito l'acquisizione di un numero sufficiente di dati. Ad esempio, non sempre il quadro clinico dei pazienti ha permesso il proseguimento dello studio o, in altri casi, è stata rilevata l'esigenza di trasferire il neonato in un reparto ospedaliero diverso. In alcuni pazienti, inoltre, il sensore CGM non è stato in grado di misurare la glicemia, o ha smesso di funzionare prima del previsto. Per quanto riguarda i soggetti appartenenti al dataset analizzato in questo studio l'età gestazionale media è di 29+5 settimane (range: 24+1 ÷ 35+1 settimane) con peso alla nascita medio di 1298g (range: 610 ÷ 2390g).



Fig. 15. A sinistra la foto del sensore correttamente posizionato sulla gamba del neonato, a destra il dispositivo è stato correttamente rimosso al termine dell'acquisizione. Si può notare l'impatto limitato che comporta l'inserimento del catetere nella gamba del paziente. Preso da [36].

Per l'acquisizione dei dati relativi alla glicemia dei pazienti si è utilizzato un sensore di monitoraggio continuo del glucosio posizionato sulla parte laterale della coscia del neonato nelle 48 ore successive alla nascita. In base alla disponibilità al momento dell'applicazione, sono stati utilizzati i sensori Enlite[®] della casa produttrice Medtronic (Medtronic Minimed, Northridge, CA, USA) oppure il Dexcom G5[®] della casa produttrice Dexcom Inc (San Diego, CA, USA). In entrambi i casi, il dispositivo monitora in maniera mininvasiva la glicemia del neonato, acquisendo ogni 5 minuti un campione attraverso un catetere posizionato sottocute (fig. 15). Il sensore è in grado di generare allarmi nel caso in cui si verificano determinate situazioni. Ad esempio, se impostato dall'utente, può richiamare l'attenzione del personale medico nel caso in cui la glicemia di un soggetto superi determinate soglie critiche o in caso di malfunzionamenti che richiedono l'intervento di un operatore. In particolare, è utile sottolineare che il sensore necessita di due calibrazioni nell'arco della giornata, che vengono effettuate tramite prelievo sanguigno dal tallone e conseguente misura della glicemia dal campione prelevato. Nel caso in cui questa procedura non venga effettuata in tempo, l'acquisizione del segnale si interrompe creando gap temporali. Oltre da una mancata calibrazione, i buchi temporali possono essere causati da malfunzionamenti generici o dalla necessità di rimuovere il sensore per consentire specifiche procedure cliniche. In ogni caso, il dispositivo è in grado di tenere in memoria la natura del problema e al termine dell'acquisizione restituire una lista dettagliata, con relativo riferimento temporale, di tutti gli allarmi attivati durante il funzionamento del sensore. In questo modo è possibile effettuare un primo controllo visivo della bontà dei dati ed eventualmente individuare gli intervalli temporali dove prestare particolare attenzione nel successivo studio del tracciato glicemico. L'analisi e la gestione dei

gap temporali verrà affrontata dettagliatamente nel paragrafo 2.2.3. In definitiva, il dataset contenente le informazioni relative alla glicemia dei pazienti è composto da 47 segnali CGM con durata media di 5233 minuti (3.6 giorni) in un range: 1205 ÷ 8631 minuti (20 ore ÷ 6 giorni). I dati grezzi composti da data di acquisizione e valore glicemico misurato, nonché la lista di allarmi generati, sono stati riportati in un unico file in formato “Excel”.

In concomitanza con l’inizio dell’acquisizione del segnale glicemico viene posizionata la cuffia NIRS per monitorare l’attività cerebrale del paziente. A tale scopo è stato utilizzato il dispositivo “*NTS fNIRS system*” della casa produttrice Gowerlabs (Londra, UK). L’apparecchiatura multicanale consente di effettuare misure sia come spettroscopia nel vicino infrarosso sia come tomografia ottica diffusa (*Diffuse Optical Tomography - DOT*). Il sistema NTS è composto da diodi laser di classe I in grado di emettere una radiazione infrarossa a lunghezze d’onda di 780 nm e 850 nm e può supportare fino ad un massimo di 16 sorgenti e 16 rilevatori. Questo sistema è completamente non invasivo, non rilascia radiazioni ionizzanti ed è dunque ideale per l’acquisizione di dati relativi all’emodinamica cerebrale con una buona risoluzione spaziale e temporale in neonati, bambini e soggetti vulnerabili. Inoltre, la strumentazione occupa un ingombro ridotto ed è quindi possibile trasportarla agevolmente [68].

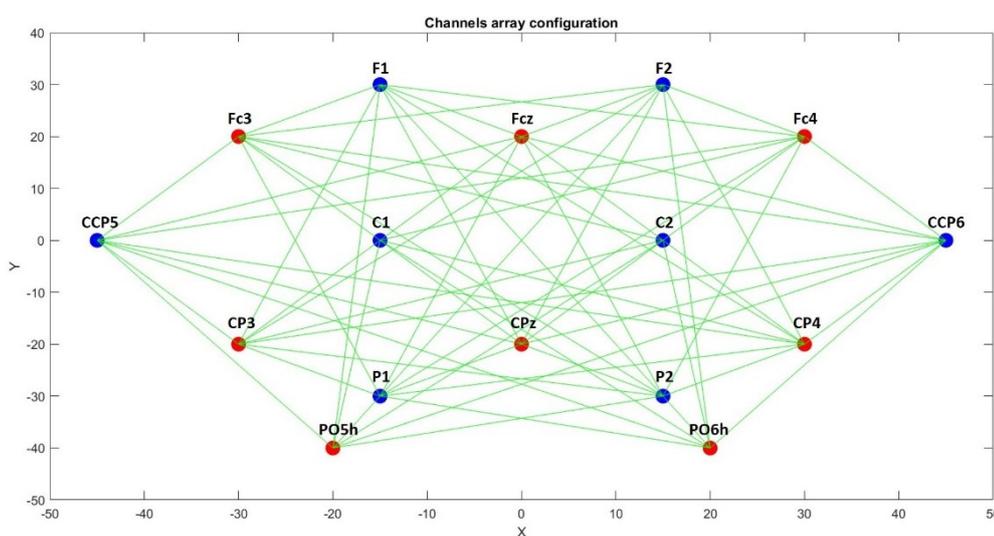


Fig. 16. Disposizione delle sorgenti, rilevatori e canali utilizzati per questo studio

Nel presente studio, l’acquisizione è stata effettuata utilizzando una configurazione intermedia ad 8 sorgenti e 8 rilevatori per un totale di 64 canali per lunghezza d’onda. Essi sono stati posizionati sopra le seguenti aree cerebrali di interesse: parietale, motoria, occipitale superiore, temporale superiore e posteriore frontale. È stata utilizzata la cuffia “NeoCAP” sulla quale sono state posizionate le sorgenti e i rilevatori seguendo il sistema internazionale elettroencefalografico 10-5 (fig. 16). La cuffia impiegata è disponibile in varie taglie (dai 24 ai

28 cm di circonferenza) in modo da accomodare teste neonatali di dimensione diversa. Il materiale interno posto a contatto con la cute del bambino è poliuretano flessibile, di norma utilizzato per la prevenzione della formazione di piaghe da decubito [59]. Per aumentare il confort del neonato durante l'acquisizione si è deciso di rimuovere i sensori posizionati sulla zona occipitale laterale in quanto potrebbero recare disturbo in posizione supina. La cuffia utilizzata e il setup sperimentale sono raffigurati in figura 17.

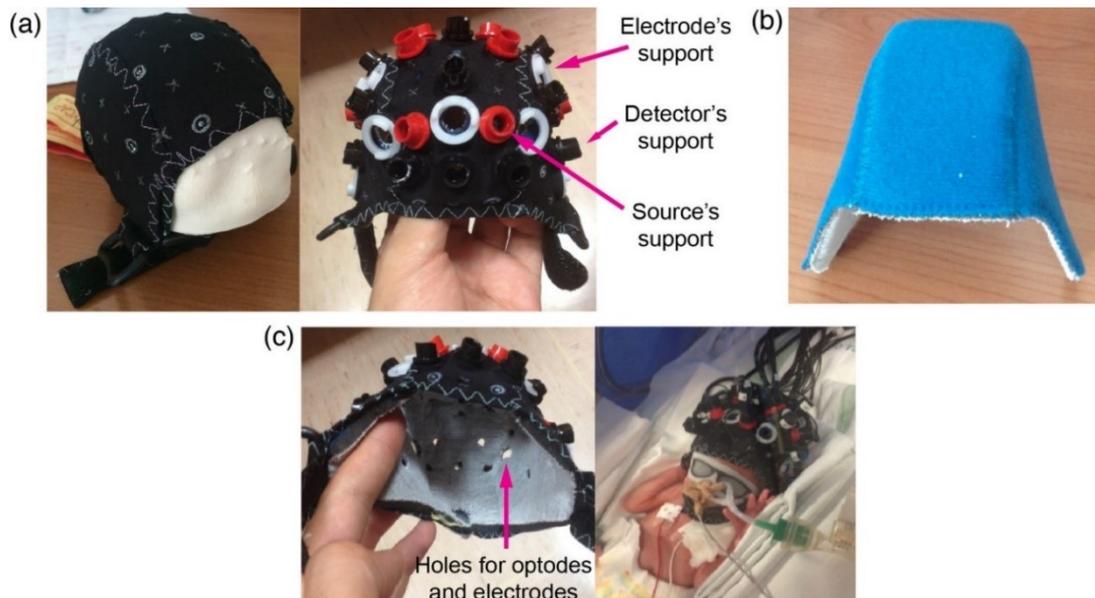


Fig. 17. (a) A sinistra si può osservare lo strato esterno della cuffia con i punti di riferimento del sistema 10-10, a destra lo stesso strato con posizionati i supporti per gli optodi. (b) Strato interno della cuffia in poliuretano flessibile creato ad hoc per aderire allo scalpo dei neonati. (c) A sinistra i due strati sono strati sigillati facendo combaciare i fori nei quali verranno posizionati gli optodi, a destra si può notare l'intero setup sperimentale durante l'acquisizione di un soggetto. Preso da [59].

L'array utilizzato soddisfa le due condizioni fondamentali che consentono di eseguire la DOT: i canali sono sovrapposti e posizionati a distanza variabile. In questo modo è possibile rispettivamente aumentare la risoluzione spaziale e fornire informazioni acquisite a profondità diverse all'interno del cervello del neonato. La distanza tra canali è nel range: $11.18 \div 78.26$ mm. L'acquisizione del segnale è continua ed avviene con un passo di campionamento di 0.1 secondi. Ad intervalli di 50 minuti (corrispondenti a 30001 campioni rilevati), il sistema è in grado di inviare in maniera automatica il file contenente tutte le informazioni acquisite al computer collegato alla strumentazione NTS, il quale salverà il documento utilizzando un nome impostato dall'utente ma che deve obbligatoriamente contenere l'identificativo del paziente, la data compresa di orario di inizio acquisizione e il numero progressivo del file. Nel caso in cui sia richiesto di interrompere e successivamente riprendere l'acquisizione, il nuovo dataset sarà nominato utilizzando lo stesso schema del precedente aggiungendo un riferimento che consente all'operatore di identificare separatamente i vari subset durante le successive analisi. Utilizzando l'organizzazione del database appena esposta è possibile caricare agevolmente i dati

NIRS relativi solamente agli intervalli temporali glicemici di interesse tramite una semplice concatenazione dei file, senza dover necessariamente utilizzare l'intero dataset, consentendo quindi di risparmiare un notevole spazio in memoria. Tuttavia, nonostante l'impostazione comune, la scelta finale del nome per i file NIRS spetta all'operatore il quale può non essere lo stesso per tutti i pazienti acquisiti nel corso dello studio. Per questo motivo non è stato possibile creare un codice totalmente automatico che consente di analizzare i dati NIRS, ma è necessario applicare la strategia migliore valutando caso per caso.

Essendo il sensore del glucosio e l'apparecchiatura NIRS due sistemi separati non in grado di comunicare tra di loro, la fase di sincronizzazione dei tracciati è di fondamentale importanza. L'applicazione del CGM e del caschetto NIRS richiede la presenza di personale medico specializzato che non sempre è disponibile, come può non esserlo la strumentazione necessaria. Per questo motivo, l'inizio reale dell'acquisizione del segnale glicemico può avvenire prima o dopo l'avvio della NIRS. Si dovrà quindi valutare il dataset di ogni singolo paziente, in modo da sincronizzare i due tracciati e verificare se il periodo di acquisizione comune ai due segnali contiene gli intervalli temporali di interesse da analizzare. Nel caso in cui questa condizione non è verificata, si dovrà procedere con l'esclusione del paziente dall'analisi. Nei prossimi capitoli, ove richiesto, verranno riportati nel dettaglio tutti i criteri di esclusioni applicati nei singoli casi esaminati.

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il software di calcolo numerico e analisi statistica MATLAB con i relativi *toolbox* e, ove necessario, sono state create funzioni *ad hoc*. Per l'analisi dei dati NIRS è stato utilizzato il pacchetto *HOMER 2*, mentre per la creazione delle *mesh* volumetriche e la risoluzione del *forward problem* per la ricostruzione delle immagini DOT si è utilizzato il *toolbox open source NIRFASTer* [69].

2.2 ANALISI GLICEMICA

In questo capitolo verranno esposti gli step principali utilizzati per effettuare l'analisi glicemica dei tracciati CGM presenti all'interno del database. Si otterranno, quindi, alcune metriche che verranno utilizzate nelle successive analisi per valutare l'esistenza di una relazione tra variazioni glicemiche e alterazioni della connettività cerebrale a riposo misurata prima e dopo l'insorgenza di tali variazioni glicemiche. Dopo una prima fase indispensabile di standardizzazione dei segnali CGM, verrà descritto l'algoritmo utilizzato per l'identificazione e la classificazione degli eventi glicemici e degli intervalli di euglicemia. Particolare attenzione verrà posta nella descrizione della strategia utilizzata per la gestione dei gap temporali, fenomeno inevitabile che si riscontra quando si analizzano dati di natura biologica. In conclusione, saranno definite le metriche glicemiche estratte dall'algoritmo.

2.2.1 Standardizzazione dei tracciati CGM

I dati glicemici ottenuti tramite CGM per ogni paziente sono stati riportati, dall'operatore incaricato, in un foglio di calcolo elettronico *Excel* al termine di ogni acquisizione. Nonostante la presenza di campi comuni, i dati sono stati trascritti utilizzando formattazioni diverse a discrezione del personale sanitario presente al termine del rilevamento. Per questo motivo, prima di procedere con l'analisi formale dei dati è stato necessario effettuare la standardizzazione del dataset convertendo singolarmente i dati in un formato comune. A tal proposito è stato creato un nuovo file *Excel* nel quale sono stati trascritti i dati di tutti i pazienti riportando, oltre ai valori di glicemia, la data e l'ora del relativo campione nel formato europeo "gg/mm/aaaa hh:mm". Successivamente, il dataset standardizzato è stato caricato in maniera automatica da MATLAB creando una tabella per ogni paziente contenente il valore glicemico in formato *double* e l'informazione temporale in formato *datetime*. L'utilizzo di quest'ultimo è stato scelto poiché consente di utilizzare numerose funzioni integrate a MATLAB per calcolare agilmente la durata degli intervalli ed effettuare facilmente conversioni di unità di misura temporali.

Prima di procedere al salvataggio dei dati nel formato utilizzato da MATLAB sono necessari due ulteriori passaggi di preelaborazione. Il primo consiste nel rimuovere l'eventuale presenza all'interno del dataset di campioni relativi alla calibrazione. Come precedentemente riportato, il sensore di monitoraggio continuo del glucosio necessita di due calibrazioni nell'arco delle

ventiquattro ore. In base al dispositivo utilizzato queste misurazioni possono essere riportate esclusivamente nella lista degli allarmi, al di fuori del segnale acquisito, oppure possono essere inserite all'interno dei dati. In quest'ultimo caso, tali valori sono contrassegnati dalla presenza di un *flag* e dunque possono essere facilmente rimossi in maniera automatica. Successivamente, si procede all'identificazione di eventuali gap temporali presenti all'interno del segnale CGM. Poiché in alcuni casi vi può essere un ritardo di qualche minuto nella trasmissione dei dati, un gap temporale è identificato se la differenza tra l'istante di acquisizione di due campioni consecutivi è superiore o uguale a 10 minuti, cioè due volte il passo di campionamento del sensore che, nel caso in analisi, risulta essere di 5 minuti. La durata di un gap temporale è definita tramite il prodotto tra il numero di campioni mancanti e il passo di campionamento. Sulla base di queste due definizioni è stato creato un algoritmo in grado di identificare la data di inizio e fine di un gap e di calcolarne la relativa durata. Per ottenere un segnale completo da poter utilizzare nelle analisi successive, i buchi temporali sono stati sostituiti con il valore medio calcolato tra l'ultima e la prima misura correttamente acquisita. Di conseguenza, è stato necessario creare anche un vettore dei tempi omogeneo tra la data di inizio e fine rilevazione glicemica, contenente il riferimento temporale di acquisizione con passo di campionamento uniforme e costante pari a cinque minuti. È importante sottolineare che questo metodo di correzione dei gap temporali è provvisorio ed è stato effettuato solamente per ottenere un segnale omogeneo. Nel paragrafo 2.2.3 verrà esposta una strategia più rigorosa ed ottimizzata per la gestione dei gap temporali all'interno di dati glicemici.

Per effettuare la preelaborazione è stata creata una funzione MATLAB in grado di restituire e salvare in maniera automatica l'intero dataset in un formato standardizzato. In particolare, i file *.mat* prodotti dall'algoritmo sono stati salvati utilizzando un nome comune contenente l'identificativo numerico del paziente. Anche la struttura interna ai singoli file è standardizzata; oltre ad una tabella che racchiude il segnale glicemico e la griglia temporale, sono presenti anche le informazioni relative ai gap temporali identificati in termini di indice di inizio e fine, nonché il numero di campioni mancanti. L'algoritmo consente inoltre di visualizzare nella *Command Window* di MATLAB informazioni utili sul segnale glicemico e sui risultati ottenuti tramite i vari step di preelaborazione; un esempio è riportato in figura 18. Al termine di queste operazioni, il database risulta standardizzato e può essere facilmente caricato nell'ambiente MATLAB per procedere alle successive analisi del tracciato glicemico.

```

=====
PATIENT 1
=====

CGM INTERVAL DATE
Start : 24-Mar-2020 18:35:00
End   : 28-Mar-2020 23:35:00

CGM CALIBRATION CORRECTIONS: NOT REQUIRED

CGM DATA GAP
Number of gap      : 7
Gap date interval :
25-Mar-2020 12:25:00 - 25-Mar-2020 13:05:00 : 40 minutes
26-Mar-2020 01:10:00 - 26-Mar-2020 01:15:00 : 5 minutes
26-Mar-2020 19:25:00 - 27-Mar-2020 01:00:00 : 335 minutes
27-Mar-2020 10:50:00 - 27-Mar-2020 11:20:00 : 30 minutes
27-Mar-2020 17:25:00 - 28-Mar-2020 00:00:00 : 395 minutes
28-Mar-2020 06:00:00 - 28-Mar-2020 10:30:00 : 270 minutes
28-Mar-2020 16:35:00 - 28-Mar-2020 17:35:00 : 60 minutes

```

Fig. 18. Esempio di rappresentazione dei risultati ottenuti dall’algoritmo di preelaborazione del segnale glicemico per il paziente numero 01. Sono riportati i riferimenti temporali relativi all’acquisizione e alla presenza di gap, nonché se è necessaria la correzione dei campioni relativi alla calibrazione del sensore.

2.2.2 Definizione di evento glicemico ed intervallo di euglicemia

Per l’identificazione e classificazione degli eventi glicemici sono state utilizzate le seguenti soglie di concentrazione di glucosio, specifiche per neonati molto prematuri, definite nello studio di Galderisi et al. [36]:

- EUGLICEMIA (*baseline*): 72-144 mg/dL;
- IPOGLICEMIA MODERATA (*mild hypoglycemia*): 47-71 mg/dL;
- IPOGLICEMIA GRAVE (*severe hypoglycemia*): <47 mg/dL;
- IPERGLICEMIA MODERATA (*mild hyperglycemia*): 145-180 mg/dL;
- IPERGLICEMIA GRAVE (*severe hyperglycemia*): >180 mg/dL.

L’analisi automatica del tracciato CGM consiste nell’individuare e classificare tutti gli eventi glicemici manifestati dal soggetto durante il periodo di osservazione. Un evento glicemico viene rilevato se almeno tre campioni consecutivi risultano essere all’esterno dell’intervallo di euglicemia. Per identificare l’inizio e la fine di un evento il segnale deve essere stabile all’interno della *baseline* per almeno 15 minuti. Per questo motivo viene utilizzata una finestra mobile nella quale si verifica che tutti i campioni contenuti siano nel range di euglicemia e che la differenza assoluta tra i valori di concentrazione di glucosio nei 15 minuti in analisi sia minore o uguale a 15 mg/dL. Nel caso in cui queste due condizioni vengono contemporaneamente rispettate, il primo o l’ultimo valore della finestra mobile viene

identificato rispettivamente come inizio o fine dell'evento glicemico. In caso contrario, la finestra mobile viene traslata di un campione (in avanti o indietro, in base a se si sta cercando l'inizio o la fine) e l'analisi ripetuta, fino a che le condizioni non vengono soddisfatte. È importante sottolineare che un evento non può iniziare né finire all'interno di un gap temporale; in questa circostanza viene considerato come istante iniziale o finale rispettivamente l'ultimo o il primo campione in *baseline* correttamente acquisito. Inoltre, eventuali eventi sovrapposti vengono uniti e considerati come un singolo episodio. L'algoritmo consente di restituire un *flag* nel caso in cui l'acquisizione del segnale CGM inizi o finisca al di fuori del range di euglicemia.

Dopo aver definito gli eventi glicemici presenti all'interno del tracciato CGM, si procede alla loro classificazione utilizzando le soglie sopracitate. In particolare, un evento viene considerato grave (*severe hypoglycemia* o *severe hyperglycemia*) se almeno tre campioni glicemici consecutivi sono al di fuori della *baseline* e sopra/sotto la soglia di iperglicemia/ipoglicemia grave; viene classificato come moderato (*mild hypoglycemia* o *mild hyperglycemia*) nel caso in cui almeno tre campioni glicemici consecutivi sono al di fuori della *baseline* ma non superano le soglie gravi. L'algoritmo inoltre è in grado di rilevare e raggruppare in un'ulteriore categoria (*'hypo/hyper'*) eventi che presentano sia picchi ipoglicemici che iperglicemici.

In maniera complementare, tutti i campioni che non appartengono ad un evento glicemico rappresentano gli intervalli di euglicemia. Essi sono definiti tra il primo campione successivo alla fine di un evento glicemico e si concludono in corrispondenza dell'ultimo campione precedente all'inizio di un nuovo episodio.

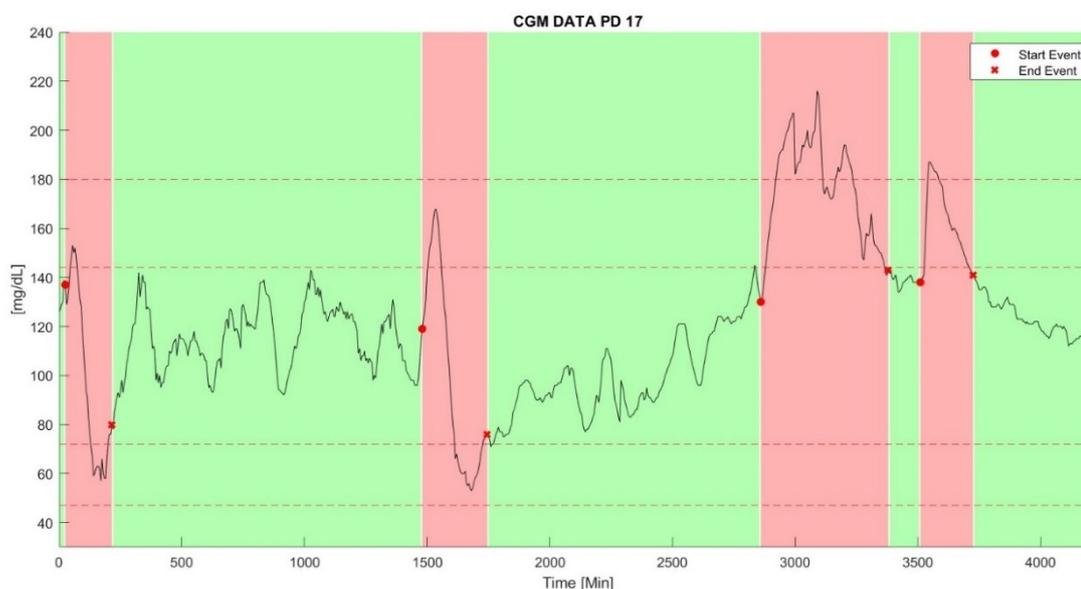


Fig. 19. Rappresentazione del segnale CGM relativo al paziente numero 17 ottenuto dall'algoritmo di analisi glicemica automatica. Le aree verdi corrispondono agli intervalli di euglicemia mentre quelle rosse ad eventi glicemici. Si possono notare due eventi 'Hypo/Hyper' e due eventi di iperglicemia grave. Nessun gap temporale è presente all'interno del segnale.

Al termine del rilevamento e della classificazione, l'algoritmo restituisce i risultati dell'analisi glicemica nella *Command Window* di MATLAB sottoforma di tabella e rappresenta l'andamento del segnale CGM evidenziando attraverso un codice colore gli eventi glicemici e gli intervalli di euglicemia. In figura 19 è riportato a titolo esemplificativo il tracciato CGM del paziente numero 17 ottenuto in uscita dall'analisi glicemica; le aree verdi corrispondono agli intervalli di euglicemia mentre le regioni rosse rappresentano gli eventi glicemici. I primi due eventi sono stati classificati come "hypo/hyper" poiché presentano un picco ipoglicemico seguito immediatamente da uno iperglicemico; gli ultimi due, invece, sono definiti come iperglicemie gravi.

2.2.3 Gestione dei gap temporali

Come precedentemente riportato, i dati CGM possono presentare numerosi gap temporali di diversa durata. In altre parole, possono essere presenti porzioni di segnale nelle quali non è stato possibile misurare il relativo valore glicemico. In questo modo si creano vere e proprie discontinuità all'interno del tracciato che possono intaccare negativamente la bontà delle successive analisi statistiche. In particolare, maggiore è la durata del gap temporale minore sarà l'affidabilità di una certa misura. Per questo motivo è di fondamentale importanza trovare un approccio statisticamente elegante in grado di gestire la presenza di gap temporali nei dati del glucosio.

A seguito di una approfondita analisi della letteratura, si è deciso di utilizzare il metodo basato sull'interpolazione lineare presentato nello studio di Fonda et al. [70]. Tale strategia è composta da due fasi: una di identificazione e una di correzione. Un gap viene identificato se la differenza tra gli istanti temporali di acquisizione di due valori consecutivi è maggiore di 10 minuti. La sua durata è calcolata tramite il prodotto tra il numero di campioni mancanti e il passo di campionamento, che nel nostro caso risulta essere di 5 minuti. Successivamente si procede alla fase di correzione del gap temporale. Essa consente di ottenere il valore stimato per ogni campione mancante all'interno della discontinuità attraverso l'implementazione della seguente equazione:

$$BG(i) = BG(i - 1) + \left[\frac{\Delta BG}{(ms - 1)} \right] \quad (2.1)$$

dove: $BG(i)$ corrisponde al valore corrente di glucosio che si vuole calcolare, $BG(i-1)$ è il valore di glucosio all'istante precedente, ΔBG è la differenza tra il primo e l'ultimo valore correttamente acquisito dal segnale a cavallo del gap temporale e ms è il numero di campioni mancanti.

Si è deciso di utilizzare la strategia proposta da Fonda et al. poiché risulta essere ottimizzata per la correzione di gap temporali presenti all'interno di segnali CGM in relazione ad alcune metriche di variazione glicemica che verranno utilizzate nei prossimi capitoli. Questo approccio consente di incrementare l'accuratezza e la precisione delle metriche del glucosio tempo-dipendenti mentre non intacca in alcun modo quelle tempo-indipendenti. L'autore afferma di aver riscontrato miglioramenti significativi nel calcolo del MODD (variazione glicemica inter-giornaliera) e del CONGA (variazione glicemica intra-giornaliera), mentre non sono stati riscontrati cambiamenti rispetto alla bontà della stima per media e deviazione standard. D'altro canto, però, questa strategia non può essere applicata in presenza di lunghi gap temporali. Difatti, maggiore è la durata di assenza di segnale, maggiori sono le probabilità che tale metodo non sia in grado di rilevare potenziali picchi glicemici, tornati in condizioni di *baseline* prima della fine del gap. Di conseguenza, eventuali metriche di variabilità glicemica possono risultare errate [70]. Per questo motivo è necessario definire alcuni criteri in grado di catalogare un gap temporale come prevedibile o critico. Nel primo caso, la sua durata effettiva è limitata e di conseguenza può essere sostituito tramite interpolazione ottenendo i benefici sopracitati. In caso contrario, l'estensione del gap è significativa e non consente alcuna correzione priva di *bias*, in quanto, ad esempio, la probabilità che un evento glicemico possa essere intercorso ma non essere stato misurato risulta molto alta.

Poiché la presenza di un gap temporale può provocare effetti diversi a seconda si trovi all'interno di un evento glicemico o di un intervallo di euglicemia, si è deciso di trattare in maniera differente queste due situazioni critiche. Nel primo caso, un buco temporale dilatato nel tempo non consente di ottenere informazioni precise sui valori assunti dalla glicemia durante tale evento; mentre nel secondo caso non si può escludere a priori che il tracciato CGM non si sia allontanato dalla *baseline* e di conseguenza che non sia presente un picco glicemico. Poiché quest'ultima condizione risulta essere più rischiosa, il criterio che classifica questo tipo di gap temporale è più stringente.

Un evento viene considerato critico se al suo interno uno o più gap temporali presentano una delle seguenti condizioni:

- La durata di un singolo gap è maggiore o uguale del 30% della durata dell'intero evento in analisi;
- La durata di un singolo gap è maggiore o uguale a 60 minuti e la differenza di glucosio nei 30 minuti precedenti o successivi all'inizio e fine del gap è maggiore o uguale a 15 mg/dL.

Il secondo criterio è stato inserito per tenere in considerazione la variabilità del segnale glicemico nella valutazione di un gap temporale. Se un segnale presenta una cospicua instabilità negli istanti antecedenti o successivi ad un gap non è possibile prevederne con precisione il suo reale andamento e la probabilità che sia oscillato tra le soglie durante il gap temporale risulta alta. Nel caso in cui almeno una di queste condizioni risulti essere soddisfatta, l'algoritmo etichetta l'intero evento e lo esclude dal resto dell'analisi glicemica. Inoltre, poiché un gap critico non può essere corretto con il metodo di interpolazione di Fonda et al., solamente per scopi di rappresentazione del segnale, viene conservata la sostituzione iniziale effettuata con il valore medio eseguita nella fase di standardizzazione del tracciato CGM.

Un intervallo di euglicemia viene considerato critico se al suo interno vi sono uno o più gap che soddisfano la seguente condizione:

- Durata del gap maggiore o uguale al valore del primo quantile calcolato in riferimento alla durata effettiva complessiva di ogni evento per ciascun paziente.

Viene definita "durata effettiva di un evento" il tempo trascorso tra il primo e l'ultimo campione fuori soglia. Per il dataset in analisi, il valore di criticità per un gap all'interno di un intervallo di euglicemia corrispondente al primo quantile è di 45 minuti. Questa condizione è necessaria per ridurre la probabilità che all'interno di gap temporali particolarmente lunghi il sensore non abbia rilevato degli eventi glicemici sperimentati dal paziente.

In figura 20 è rappresentato il box plot della durata effettiva complessiva di ogni evento calcolato considerando l'intero dataset. Nel caso in cui sia rilevato un gap critico, l'intervallo di euglicemia viene segnalato con un *flag* e diviso in due parti, prima e dopo il gap temporale. Anche in questo caso, poiché non è possibile prevedere in alcun modo l'andamento glicemico, si mantiene, a scopo di visualizzazione, la sostituzione effettuata con la media nella fase di standardizzazione del tracciato CGM.

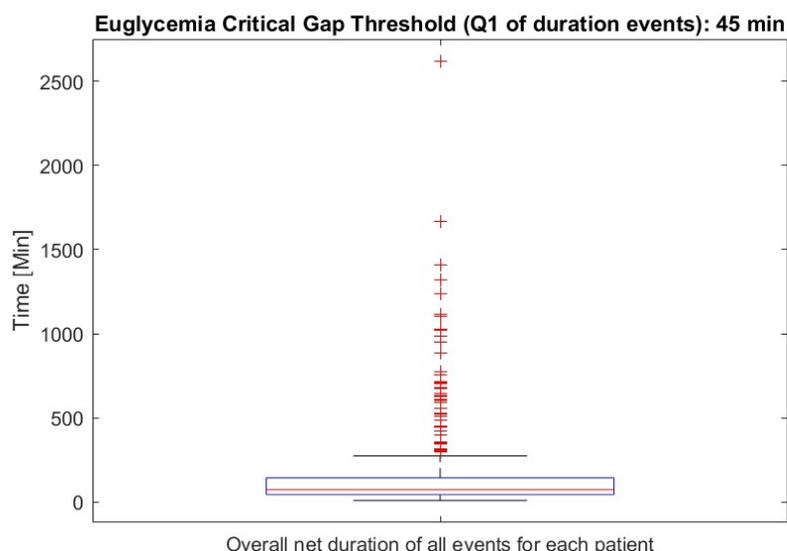


Fig. 20. Boxplot ottenuto in base alla durata effettiva di ogni evento glicemico sperimentato dall'intero dataset.

Vengono ora descritti alcuni esempi di tracciati CGM prodotti dall'algorithm per l'analisi glicemica automatica. La figura 21 rappresenta il profilo glicemico rilevato nel paziente 25. Esso è caratterizzato solamente da gap temporali che sono stati corretti utilizzando il metodo proposto da Fonda et al. (l'inizio del gap è indicato con un triangolo nero). Viceversa, nel paziente 38 (fig. 22) sono presenti 4 gap critici: tre all'interno di un intervallo di euglicemia mentre uno avviene durante un evento glicemico. Quest'ultimo è stato correttamente evidenziato ed etichettato come critico (area gialla). Per quanto riguarda la *baseline*, essa è stata suddivisa in 4 parti, escludendo i gap critici.

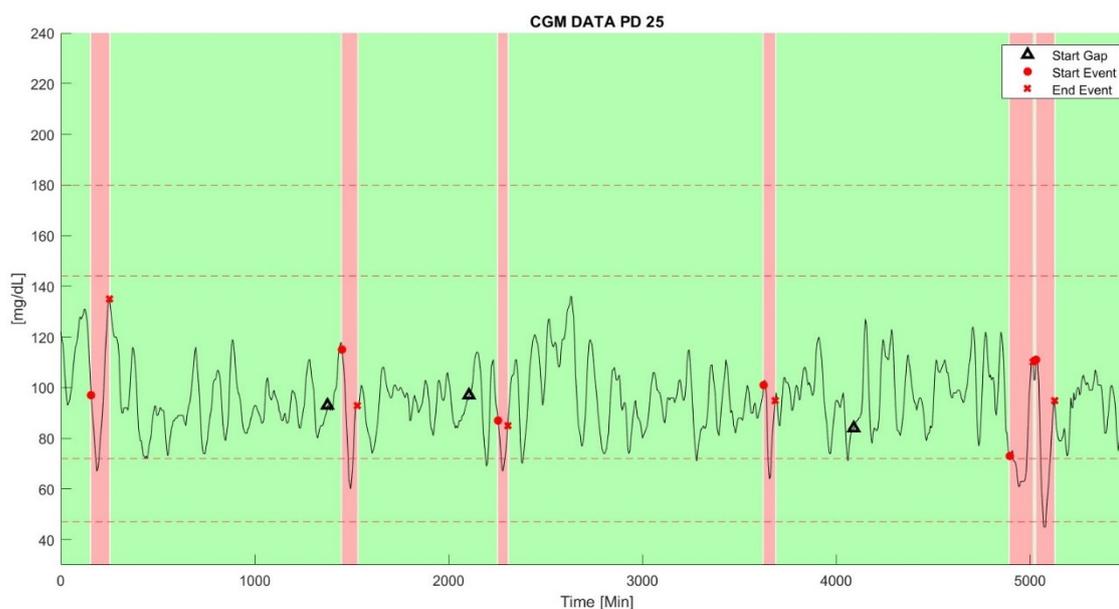


Fig. 21. Segnale CGM analizzato per il soggetto numero 25. Sono presenti 6 eventi glicemici (5 ipoglicemie moderate, 1 grave) e nessun gap critico.

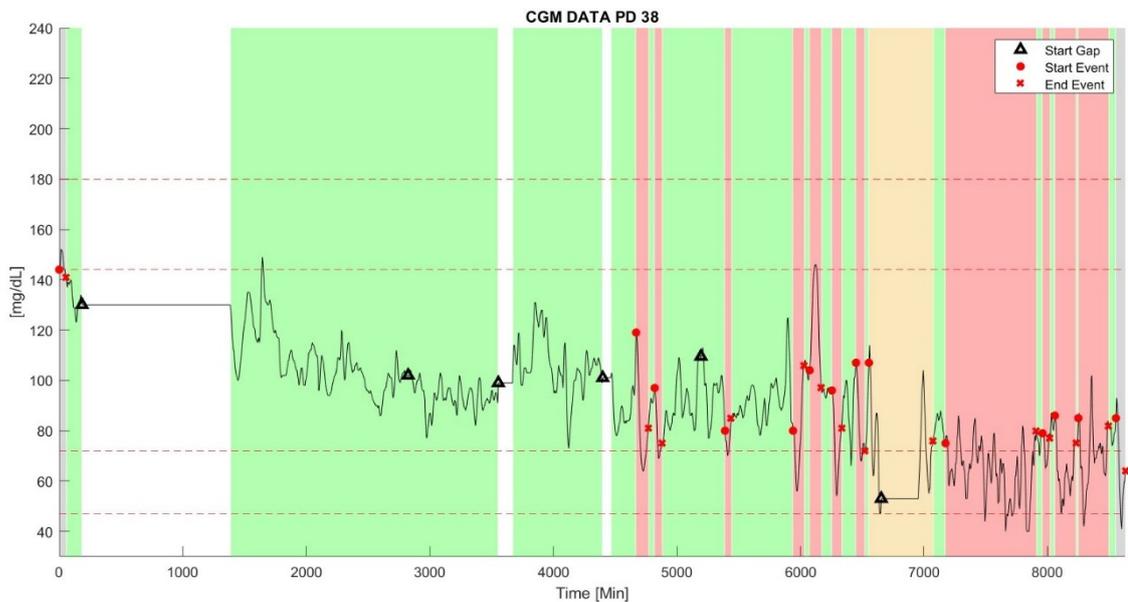


Fig. 22. Segnale CGM analizzato per il soggetto numero 38. Si possono osservare 3 gap critici all'interno di alcuni intervalli di euglicemia, evidenziati in bianco. L'area gialla corrisponde ad un evento classificato come critico in quanto presenta un gap temporale con estensione tale da non consentirne la correzione. L'area grigia corrisponde ad eventi che hanno inizio o fine al di fuori dell'acquisizione glicemica.

2.2.4 Definizione delle metriche glicemiche

L'utilizzo del sensore CGM per stimare la concentrazione di glucosio nel sangue risulta essere uno strumento molto importante per investigare retrospettivamente le variazioni glicemiche nei neonati prematuri. L'abilità di tale strumento nell'acquisire un numero elevato di misure e restituire un dataset ad alta densità, consente di calcolare numerose metriche in grado di descrivere e valutare nel dettaglio il profilo glicemico del soggetto in analisi.

Come affermato nello studio di McKinlay et al. [29] la concentrazione di glucosio nel sangue in neonati pretermine può variare in modo considerevole durante il giorno, passando rapidamente da uno stato iperglicemico prolungato ad uno ipoglicemico, o viceversa. L'instabilità glicemica che ne deriva è stata più volte associata ad alterazioni nello sviluppo neurologico. Per questo motivo, si è posta particolare attenzione nella ricerca e definizione di metriche in grado di riassumere la variabilità glicemica dei pazienti.

Prima di procedere alla definizione formale delle metriche glicemiche calcolate è importante definire alcuni aspetti fondamentali per il proseguimento della trattazione. Come risultato dell'analisi glicemica si sono ottenute informazioni sulla durata e sulla natura degli eventi, nonché sugli intervalli di euglicemia. Poiché lo scopo di questa tesi è di valutare una possibile relazione tra variazioni del segnale CGM ed eventuali cambiamenti della connettività cerebrale

a riposo tra il periodo precedente e successivo alle variazioni glicemiche calcolate, si procederà al calcolo delle metriche in riferimento solamente alla durata effettiva dell'analisi, la quale è compresa tra la prima e l'ultima finestra di euglicemia misurata dal sensore e considerata affidabile durante il pre-processamento del segnale CGM.

Di seguito vengono elencate nel dettaglio le metriche calcolate in relazione ai risultati ottenuti dall'analisi glicemica per ogni paziente analizzato, come proposto da Whitelaw et al. [71] e da Vigers et al. [72]:

- METRICHE BASATE SULLA STATISTICA DESCRITTIVA:
 - Media, Deviazione Standard, Mediana, Deviazione Mediana Assoluta (MAD);
 - Primo Quantile (Q1), Terzo Quantile (Q3), Scarto Interquartile (IQR);
 - Valore glicemico Minimo e Massimo (MIN e MAX);
 - Area sottesa alla curva CGM normalizzata per la durata effettiva dell'analisi glicemica (AUC_n).
- METRICHE BASATE SULLA DURATA E NATURA DEGLI EVENTI GLICEMICI:
 - Percentuale di tempo totale speso:
 - al di fuori del range di euglicemia (TOR%)
 - all'interno del range di euglicemia (TIR%)
 - al di sopra del range di euglicemia (TAR%)
 - al di sotto del range di euglicemia (TBR%);
 - Numero eventi di ipoglicemia normalizzato rispetto al numero totale di eventi (HYPO_n);
 - Numero eventi di iperglicemia normalizzato rispetto al numero totale di eventi (HYPER_n).
- METRICHE BASATE SULLA VARIABILITÀ GLICEMIA:
 - Coefficiente di variazione calcolato come rapporto tra deviazione standard e media del segnale CGM (CV);
 - *Average Absolute Rate of Change* calcolato come media del segnale differenze prime, preso in valore assoluto (AARC);
 - *SD Rate of Change* calcolato come la deviazione standard del segnale differenze prime (SDRC);
 - *Mean Of Daily Differences* è la variazione glicemica intergiornaliera calcolata come il valore medio della differenza assoluta tra due valori di glicemia rilevati allo stesso orario in due giorni consecutivi (MODD);

- *Continuous Overall Net Glycemic Action* è la variazione glicemica intragiornaliera calcolata come la deviazione standard del segnale ottenuto tramite la sottrazione di ogni valore glicemico osservato e il relativo valore acquisito n ore prima; con n = 1, 2 e 4 (CONGA_1, CONGA_2, CONGA_4).

Prima di procedere con l'esposizione delle analisi successive è importante effettuare alcune considerazioni sulle metriche appena citate. In particolare, come suggerito da McKinlay et al. [29], le metriche che si riferiscono al tempo speso da un paziente in determinate bande glicemiche risultano essere più informative rispetto al numero di eventi glicemici sperimentati dal paziente. Inoltre, l'area sottesa alla curva CGM normalizzata è un parametro utilizzato in clinica come supporto alla generazione di allarmi in quanto è un buon strumento per predire imminenti eventi glicemici. Con riferimento alle metriche proposte da Whitelaw et al. [71], per il calcolo della variabilità intragiornaliera si è deciso di considerare la *Continuous Overall Net Glycemic Action* (CONGA) rispetto alla *Mean Amplitude of Glycemic Excursion* (MAGE) poiché, a differenza di quest'ultima, non richiede di impostare in maniera arbitraria i valori di soglia per la definizione dei picchi glicemici.

2.3 SELEZIONE DEL CAMPIONE RAPPRESENTATIVO

Dopo aver esaminato i tracciati glicemici di ogni paziente presente all'interno del dataset è necessario osservare i risultati ottenuti per valutare se un paziente possiede le caratteristiche necessarie per proseguire l'analisi. Poiché si vogliono valutare gli effetti della variabilità glicemica sull'emodinamica cerebrale a riposo tramite il calcolo della connettività cerebrale nella prima e ultima finestra di euglicemia, si sono definiti i seguenti criteri di esclusione. In particolare, un paziente viene eliminato dal dataset se soddisfa almeno una delle seguenti condizioni:

- Il segnale CGM presenta almeno un gap temporale classificato come critico;
- L'acquisizione del segnale CGM inizia durante un evento glicemico;
- La percentuale di tempo totale speso al di fuori del range di euglicemia è inferiore al valore di soglia corrispondente al primo quantile calcolato in relazione all'intero dataset ($Q1 = 9.75\%$).

Come affermato in precedenza, all'interno di un gap critico non è possibile prevedere in maniera accurata l'andamento del segnale CGM. Per questo motivo un paziente che ne presenta almeno uno deve essere escluso dal dataset, in quanto non sarebbe possibile calcolare delle metriche glicemiche affidabili. Inoltre, un paziente viene estromesso anche se il suo tracciato CGM inizia al di fuori della *baseline*. Ciò è necessario poiché non è possibile escludere a priori che il primo evento non abbia già influito in maniera significativa sull'emodinamica cerebrale. Infine, se un paziente non trascorre un tempo sufficiente all'esterno del range di euglicemia non può essere preso in considerazione per questo studio in quanto potrebbero non esserci variazioni significative della connettività cerebrale. Per verificare quest'ultima condizione è stata definita una soglia corrispondente al primo quantile del tempo totale percentuale trascorso al di fuori dell'intervallo di euglicemia in relazione all'intero dataset. In figura 23 è riportato il *boxplot* ottenuto. Al termine di questa analisi sono stati esclusi 36 pazienti, riducendo il dataset ad 11 pazienti su un totale iniziale di 47.

È importante ricordare che il sensore CGM e la strumentazione NIRS non sono in grado di comunicare tra loro, per questo motivo l'inizio della registrazione dei due segnali può non avvenire in contemporanea, anche in base alla disponibilità del personale medico ed eventuali altre emergenze in TIN. Tuttavia, l'orologio del sensore CGM e quello del computer di raccolta dati NIRS sono stati opportunamente sincronizzati.

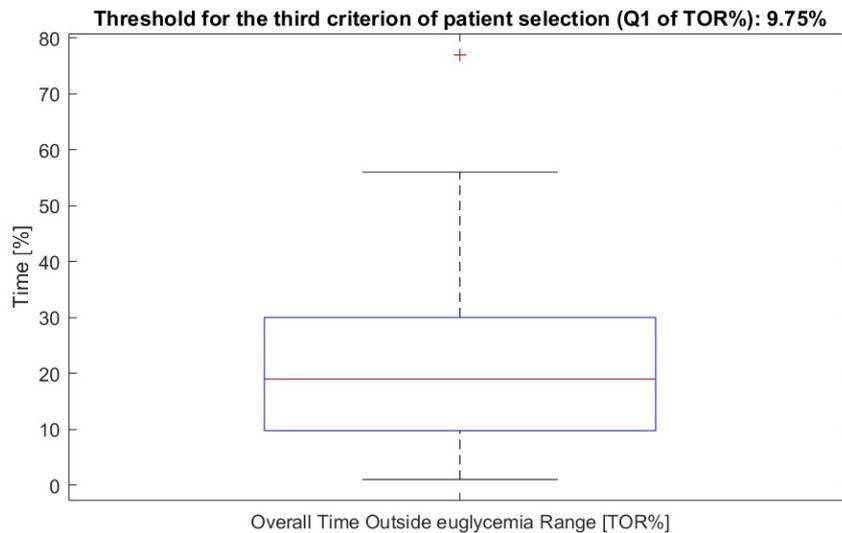


Fig. 23. Boxplot ottenuto in base al tempo totale trascorso al di fuori dal range di euglicemia valutato con riferimento all'intero dataset. Il valore del primo quantile corrisponde alla soglia utilizzata nel terzo criterio di selezione del campione rappresentativo.

È necessario, dunque, valutare se la prima e l'ultima finestra di euglicemia sono contenute all'interno del segnale NIRS o se l'acquisizione dell'emodinamica cerebrale è iniziata dopo o terminata prima. Per far ciò è stato creato un algoritmo in grado di sincronizzare in maniera automatica i dati CGM con i tracciati NIRS per ciascun paziente all'interno del dataset. Il programma carica i risultati ottenuti dall'analisi glicemica ed estrae i riferimenti temporali corrispondenti all'inizio e alla fine della prima ed ultima finestra di euglicemia. Come affermato in precedenza, nonostante l'assenza di una nomenclatura standard, i file che rappresentano il dataset NIRS contengono sempre i dettagli relativi al giorno e all'orario di inizio dell'acquisizione. L'algoritmo è in grado di estrarre questa informazione, unita alla dimensione del database, in maniera automatica. Poiché la lunghezza di un singolo file NIRS è costante, noto il passo di campionamento e il numero di campioni presenti all'interno dell'ultimo tracciato, è possibile risalire alla data di inizio e di fine acquisizione per ogni paziente. Si procede quindi a verificare se le finestre di euglicemia di nostro interesse sono contenute all'interno del database NIRS a disposizione. Poiché si presuppone che un valore di glicemia in *baseline* non provochi alterazioni nell'emodinamica cerebrale, l'intervallo di euglicemia in analisi può essere compreso anche solo parzialmente all'interno dell'acquisizione NIRS. Al termine di questo controllo, l'algoritmo estrae e salva in appositi file *.mat* esclusivamente la porzione di segnale d'interesse, sincronizzata con il tracciato CGM. Questo step è fondamentale poiché consente di ottenere un dataset omogeneo e standardizzato, riducendo significativamente la dimensione e i tempi di caricamento dei file NIRS per le future analisi. Al termine di questa fase, 3 pazienti sono stati eliminati dal database in quanto l'acquisizione NIRS non comprende la prima o l'ultima finestra di euglicemia.

Tramite un'ispezione visiva dei risultati ottenuti, si è notato che il paziente numero 5 presenta un solo gap temporale critico al termine dell'acquisizione glicemica. Poiché l'intero tracciato CGM è contenuto all'interno dei file NIRS e ha una durata consistente al resto del database, si è deciso di reintegrare tale soggetto all'interno dell'analisi contrassegnando come ultima finestra di euglicemia quella immediatamente antecedente al gap critico. Il tracciato CGM del soggetto numero 5 è riportato in figura 24.

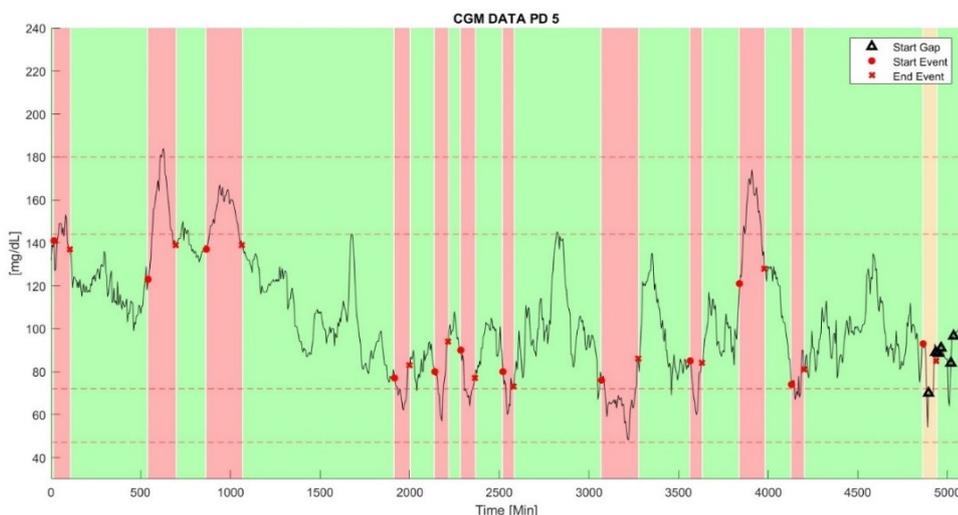


Fig. 24. Profilo glicemico del paziente numero 05. L'ultimo evento contiene un gap classificato come critico (area gialla).

I pazienti che hanno superato questa fase di selezione e che accedono all'analisi NIRS per il calcolo della connettività funzionale a riposo sono quindi 9 su 47. In tabella 1 sono riportati alcuni parametri in grado di descrivere e riassumere le caratteristiche dei pazienti nel nuovo dataset.

# PD	SESSO	SG (sett.+gg.)	PN (g)	%ile PN	CC (cm)	%ile CC	IUGR	SGA
04	F	31+3	1170	17	27,4	19	SI	NO
05	F	33+1	1231	21	27,5	24	SI	NO
08	F	31+0	1485	39	27	16	NO	NO
09	M	26+2	690	10	23	6	SI	SI
11	M	31+2	2020	88	31,5	95	NO	NO
14	M	29+5	880	3	25,5	6	NO	SI
15	M	32+6	1485	10	28	7	SI	SI
19	M	35+1	690	0	21,5	0	SI	SI
47	F	30+4	1500	65	29,5	84	NO	NO

Tab. 1. Descrizione del dataset: numero paziente (#PD), sesso, settimana e giorno di gestazione (SG), peso alla nascita (PN), percentile peso nascita, circonferenza cranica (CC), percentile circonferenza cranica, ritardo di crescita intrauterina (IUGR), piccolo per età gestazionale (SGA).

Particolare attenzione deve essere riposta nell'analisi del paziente numero 19. Nonostante sia nato alla 35+1 settimana di gestazione, ha un peso alla nascita di soli 690 g con una circonferenza cranica di 21,5 cm. Queste misure corrispondono allo zero percentile in riferimento ai valori che caratterizzano pazienti di pari età. Inoltre, è stato diagnosticato un ritardo di crescita intrauterina e risulta essere piccolo per età gestazionale (IUGR e SGA positivo). Nella successiva selezione dell'*head model* da utilizzare per la ricostruzione delle immagini DOT, quindi, non abbiamo selezionato il modello di 35 settimane, bensì abbiamo impiegato il più piccolo a disposizione, in linea con la sua circonferenza cranica.

2.4 ANALISI NIRS

In questo paragrafo verranno elencati i criteri per la ricerca della finestra migliore in cui calcolare la connettività funzionale a riposo all'interno di un intervallo di euglicemia, nonché i passaggi fondamentali per elaborare il segnale NIRS, tra cui quello relativo alla correzione degli artefatti da movimento. Dopo aver generato le matrici di sensitività con la soluzione del *forward problem*, verrà esposto il procedimento adottato per risolvere il problema inverso con la relativa ricostruzione delle immagini DOT. Al termine di questa fase si otterranno i valori della concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata mappati sulla superficie della corteccia cerebrale durante l'intervallo di euglicemia scelto per il calcolo della connettività funzionale a riposo. I risultati ottenuti saranno utilizzati per il successivo step di analisi della connettività funzionale cerebrale a riposo.

2.4.1 Generazione delle *head mesh* e calcolo delle matrici di sensitività

Prima di procedere all'analisi del segnale NIRS e con la ricostruzione delle immagini DOT è necessario generare un modello 3D della testa del neonato (*head mesh*) e conseguentemente risolvere il *forward problem*, il quale restituisce le matrici jacobiane di sensitività per ogni lunghezza d'onda dato l'array di sensori utilizzato.

Poiché l'encefalo di un neonato si sviluppa ad una velocità elevata, è di fondamentale importanza ricostruire le immagini DOT utilizzando un *head model* specifico per ogni paziente, scelto sulla base dell'età gestazionale (SG). È stato dimostrato che la struttura cerebrale di un neonato molto prematuro di 30 settimane è significativamente diversa da quella di un infante di 40 settimane nato a termine gravidanza. Per ottenere un modello estremamente accurato del paziente in analisi si dovrebbe ricorrere ad una scansione MRI paziente specifica. Poiché l'utilizzo della risonanza magnetica in neonati molto prematuri è fortemente sconsigliato e consentito solamente qualora il quadro clinico del paziente lo richieda, è necessario utilizzare un modello 3D proveniente dalla letteratura scientifica che rispecchi il più possibile le caratteristiche del paziente analizzato. Nonostante un progressivo aumento dell'uso della DOT in ambito neonatale, vi è un numero estremamente limitato di studi che propongono *head model* per neonati molto prematuri. Per il proseguimento di questo studio si è deciso di utilizzare il database prodotto da Brigadoi et al. [73], il quale propone un modello 4D, per pazienti dalle 29

alle 44 settimane di gestazione, basato su un totale di 324 scansioni MRI. Per ogni settimana di gestazione, il database contiene:

- Una maschera multistrato per identificare le varie strutture dell'encefalo (tessuto extracerebrale (scalpo e cranio), fluido cerebrospinale, materia grigia, materia bianca, cervelletto e tronco encefalico);
- Un modello volumetrico tetraedrico ad alta densità della testa;
- Un modello della superficie dello scalpo, della materia grigia e bianca;
- Posizione sulla superficie dello scalpo dei punti di riferimento del sistema EEG 10-5.

Come affermato dagli autori, la selezione di un *head model* età-specifico consente di ottenere immagini DOT anatomicamente più accurate ed interpretabili. In figura 25 sono riportati come esempio i modelli disponibili per un neonato prematuro a 29 settimane di gestazione.

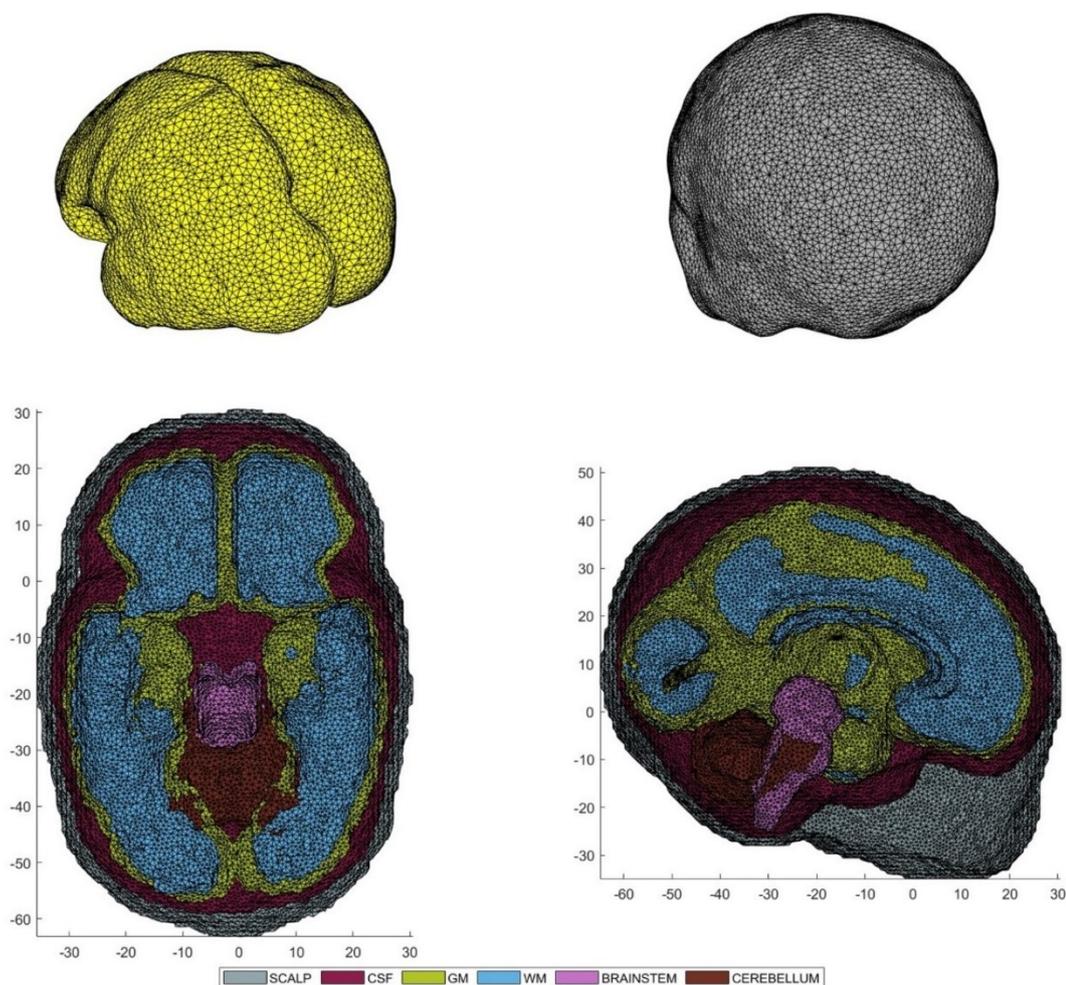


Fig. 25. Head model utilizzato per un neonato a 29 settimane di gestazione. In alto a sinistra è riportata la mesh corrispondente alla superficie della corteccia cerebrale, a destra è rappresentata la mesh dello scalpo. In basso a sinistra si trova una vista assiale del modello tetraedrico volumetrico, a destra una vista sagittale. In queste rappresentazioni si possono distinguere, attraverso un codice colore, le seguenti strutture anatomiche dell'encefalo: tessuto extra-cerebrale, liquido cerebrospinale, materia grigia, materia bianca, tronco encefalico e cervelletto.

Per uniformare l'*head mesh* e successivamente risolvere il *forward problem*, generando le matrici Jacobiane di sensitività, è stato creato un apposito codice MATLAB, il quale utilizza il toolbox open source "*NIRFASTer 2.0*". Per ogni età gestazionale nel range d'interesse 29 ÷ 35 settimane, l'algoritmo carica in maniera automatica il relativo modello. Vengono poi collocati sulla *head mesh* le sorgenti e i rilevatori utilizzando le coordinate età-specifiche dei punti di riferimento cranici 10-5 utilizzati dalla cuffia NIRS durante l'acquisizione. In questo modo si ottiene un modello 3D personalizzato sulla base dell'età gestazionale, da utilizzare per ogni paziente in analisi. Successivamente vengono impostate le proprietà ottiche che caratterizzano ogni tessuto per le due lunghezze d'onda impiegate. Sono state utilizzate le proprietà ottiche per neonati suggerite da uno studio di Uchitel et al [55] e riportate in tabella 2.

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

Tab. 2. Proprietà ottiche utilizzate in relazione a ciascun tessuto. μ_a : coefficiente di assorbimento, μ'_s coefficiente di scattering modificato, N : indice di rifrazione. ECT: tessuti extra cerebrali, CSF: fluido cerebrospinale, GM: materia grigia, WM: materia bianca. Preso da [55].

Data l'estrema insufficienza di studi su neonati molto prematuri, è importante sottolineare che sono state utilizzate proprietà ottiche per una lunghezza d'onda leggermente inferiore (735 nm) rispetto a quella utilizzata all'interno del progetto *BabyGlucoLight*. Nonostante ciò, si può ragionevolmente ipotizzare un impatto minimo di questa leggera differenza nella bontà dei risultati.

Ottenuta l'*head mesh* personalizzata per età gestazionale, completa di tutti i parametri e strutture richieste dal toolbox "*NIRFASTer 2.0*", si procede al calcolo delle matrici Jacobiane di sensitività per ognuna delle due lunghezze d'onda. Per risolvere il *forward problem* si utilizza il metodo degli elementi finiti il quale consente di simulare la propagazione della sorgente luminosa nel modello tetragonale della testa a partire dalla configurazione dell'array di sensori utilizzato. Questo metodo calcola l'assorbimento e lo scattering al passaggio della luce dividendo l'intero volume in sottogruppi di tetraedri per i quali risolve la *diffusion approximation*. In questo modo si velocizza la risoluzione del problema ottenendo agilmente le matrici di sensitività.

Al termine di questa operazione si ottiene un nuovo database standardizzato da utilizzare per le future analisi. In figura 26 vengono riportate a titolo esemplificativo due viste della matrice

Jacobiana, mappata sulla superficie corticale, ottenuta a 780 nm per un'età gestazionale di 29 settimane. Le regioni che presentano un valore elevato di sensibilità corrispondono alle aree corticali dove è possibile misurare variazioni del coefficiente di assorbimento dal segnale misurato a livello dei canali sullo scalpo.

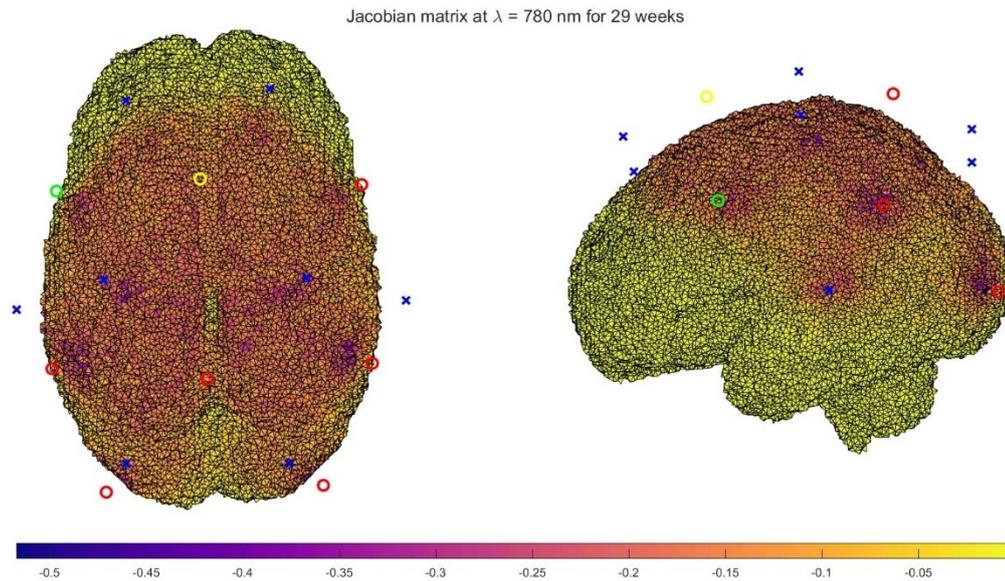


Fig. 26. Rappresentazione delle matrici di sensibilità nelle quali si possono osservare le aree della corteccia cerebrale maggiormente sensibili all'array di canali utilizzato. Le sorgenti e i rilevatori, rappresentati rispettivamente da cerchi e da croci, sono posizionati sullo scalpo, i valori di sensibilità sono mappati sulla superficie della materia grigia.

2.4.2 Criteri per la ricerca della migliore finestra in euglicemia

Dopo aver standardizzato il database NIRS ed aver estratto le porzioni di tracciato corrispondenti al primo ed ultimo intervallo di euglicemia, si procede alla ricerca della miglior finestra di 5 minuti su cui calcolare la connettività cerebrale a riposo. Per far ciò si crea una finestra mobile di 5 minuti e la si fa scorrere con passo di 1 minuto per tutto l'intervallo di euglicemia in analisi. Per ognuna di esse si calcola il *Signal-to-Noise ratio* medio, il numero di *bad channels* rimossi e il numero di nodi "sensibili", ovvero quelli sufficientemente coperti dall'array dei canali utilizzato. Viene definita "finestra migliore" quella selezionata dopo queste tre fasi:

1. *Signal-To-Noise ratio* (SNR) medio maggiore od uguale al novantesimo percentile calcolato sull'SNR di tutte le finestre identificate;
2. Numero minore di *bad channels* rimossi sulla base della loro ampiezza e tramite un'analisi spettrale;

3. Maggior numero di nodi sensibili.

Al termine della prima fase si ottengono le finestre che contengono una percentuale molto limitata di rumore rispetto al segnale utile. In figura 27 viene riportato il valore di SNR medio per ogni finestra con la relativa soglia per il paziente 08. Al termine della prima fase vengono quindi selezionate le finestre che superano la soglia del novantesimo percentile, identificate in verde nella figura di esempio.

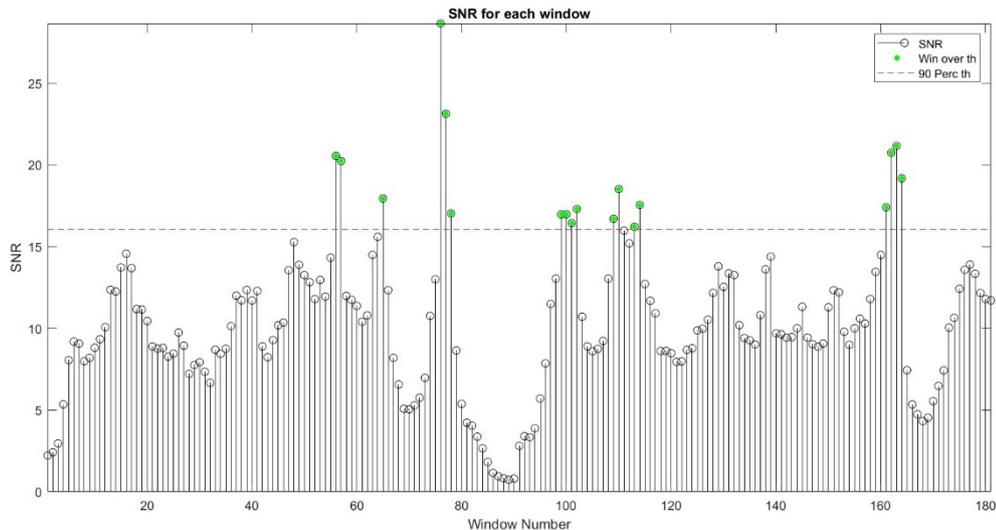


Fig. 27. Valore del SNR per ogni finestra di 5 minuti presente all'interno del segnale NIRS per il paziente 08. In verde sono contrassegnate le finestre con un SNR superiore alla soglia di selezione.

La seconda fase è leggermente più complessa e deve essere spiegata nel dettaglio. Essa consiste in due analisi da effettuare in cascata. La prima identifica e rimuove per ogni lunghezza d'onda tutti i canali che presentano un'intensità del segnale al di fuori del range $[5e-4 \div 3]$ o con un SNR minore di 1. Questi valori sono stati impostati in modo tale da mantenere solamente i canali contenenti un segnale il più possibile informativo, eliminando quelli che non riescono a rilevare una quantità sufficiente di luce, o che sono in saturazione, o che sono per lo più rumorosi. Successivamente, viene effettuata un'analisi spettrale per rimuovere i canali che presentano degli andamenti troppo regolari e di conseguenza non fisiologici. Questo step è necessario in quanto a seguito di un'ispezione visiva dei risultati, in alcuni pazienti, si è notata la presenza di canali con un andamento sinusoidale. Questo fenomeno può essere causato dall'esposizione diretta alla luce della stanza del rilevatore dovuto ad un suo parziale disaccoppiamento dallo scalpo oppure ad infiltrazioni di luce proveniente da macchinari usati in TIN. Per effettuare l'analisi spettrale si è calcolata la trasformata discreta di Fourier (DFT) tramite l'algoritmo *fft* di MATLAB. Si è quindi ricavato il segnale densità spettrale di potenza che consente di mettere in relazione ogni frequenza dello spettro con il relativo valore di

potenza. Poiché si vogliono identificare le frequenze che presentano rumore luminoso e mantenere quelle corrispondenti al segnale fisiologico, vengono eliminati tutti i canali che presentano un valore di potenza superiore ad $0.001 \text{ A}^2/\text{Hz}$ nelle bande $[0.05 \div 2] \text{ Hz}$ e $[3 \div 4] \text{ Hz}$, ipotizzando che le frequenze di interesse per quanto riguarda l'emodinamica sono quelle lente, inferiori ai 0.05 Hz , e che il battito cardiaco nei neonati è compreso tra 2 e 3 Hz . In figura 28 è riportato il segnale NIRS di un canale caratterizzato da un andamento sinusoidale regolare correttamente rimosso dall'analisi spettrale. Al termine di questo step, per ogni finestra si ottiene il numero di canali rimossi e in maniera complementare il numero di *good channels*. Superano questa fase solamente le finestre che hanno un numero di *good channels* superiore al valore mediano dei canali mantenuti, calcolato in riferimento a tutte le possibili finestre all'interno dell'intervallo di euglicemia analizzato.

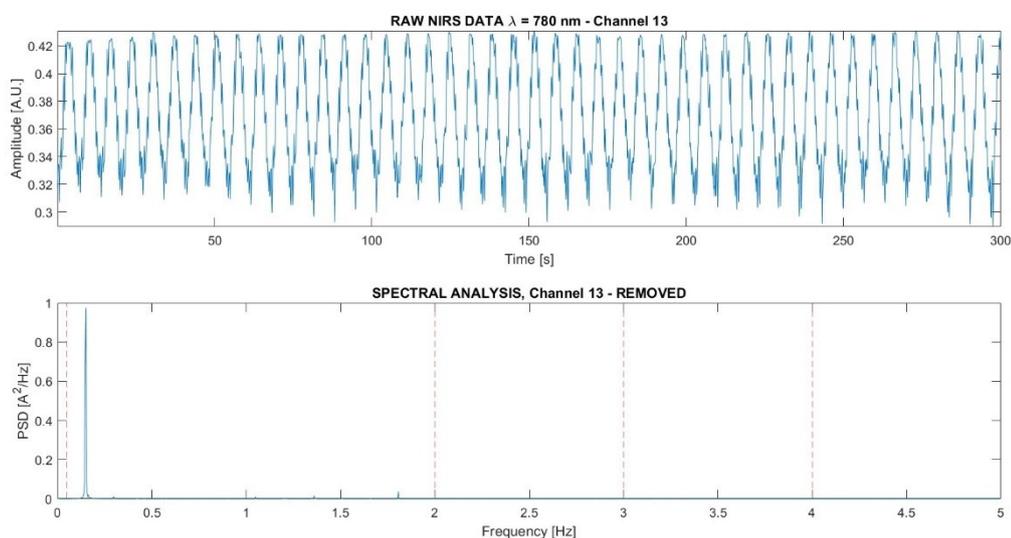


Fig. 28. Segnale NIRS del canale 13 per il paziente 08. Nella parte superiore si può osservare che il tracciato risulta essere particolarmente regolare e non fisiologico. Nella parte inferiore vi è il segnale densità di potenza spettrale dove si può apprezzare un picco significativo ad una frequenza ben precisa. Questo canale è stato correttamente rimosso.

Ora che si sono conservate solamente le finestre con buon SNR e con un numero elevato di *good channels*, si procede all'ultimo step di selezione. Esso consiste nel valutare per ogni finestra sopravvissuta se l'array di canali è in grado di fornire una sensibilità sufficiente sulla superficie della materia grigia (quindi un numero elevato di canali sovrapposti distribuiti omogeneamente) in modo da poter ricostruire le immagini in modo affidabile. Per fare ciò si analizza la matrice Jacobiana di sensibilità a 780 nm , lunghezza d'onda scelta in modo arbitrario. Tale matrice ha dimensione [numero di canali x numero di nodi]. In base alla finestra analizzata, si eliminano le righe corrispondenti ai *bad channel* rimossi dallo step precedente. Si procede dunque a sommare lungo le colonne ogni valore della matrice in modo tale da ottenere per ogni nodo un unico valore che corrisponde al suo livello totale di sensibilità all'array di

canali utilizzato. Per definire se un nodo è sufficientemente sensibile o meno si confronta il numero appena ottenuto con un valore di soglia denominato “*Coverage Threshold*”, proposto in uno studio di Brigadoi et al. [74]. Il valore di “*Coverage Threshold*” viene calcolato dalla seguente formula:

$$C_{threshold} = \frac{\log\left(\frac{100 + p_{thresh}}{100}\right)}{\frac{act_{vol}}{\hat{V}} * \Delta\mu_a} \quad (2.2)$$

con: p_{thresh} uguale a 1%, act_{vol} pari a 1000 m^3 , \hat{V} è la mediana del volume di Vonoroi calcolato in riferimento ai nodi della *mesh* della corteccia cerebrale e $\Delta\mu_a$ corrisponde al valore approssimato del cambiamento nel coefficiente di assorbimento atteso durante una risposta emodinamica, impostato a 0.001 mm^{-1} . Di conseguenza, se un nodo ha un valore di sensibilità maggiore del “*Coverage Threshold*” viene conteggiato come sensibile. La finestra che presenta il maggior numero di nodi sensibili viene definita come migliore poiché risulta essere più sensibile all’array di *good channels* utilizzato. In figura 29 è rappresentata, a scopo esemplificativo, la matrice di sensibilità e la distribuzione dei *good channels* (in nero) nella miglior finestra identificata per il paziente 08; si nota una buona copertura corticale da parte della configurazione adottata.

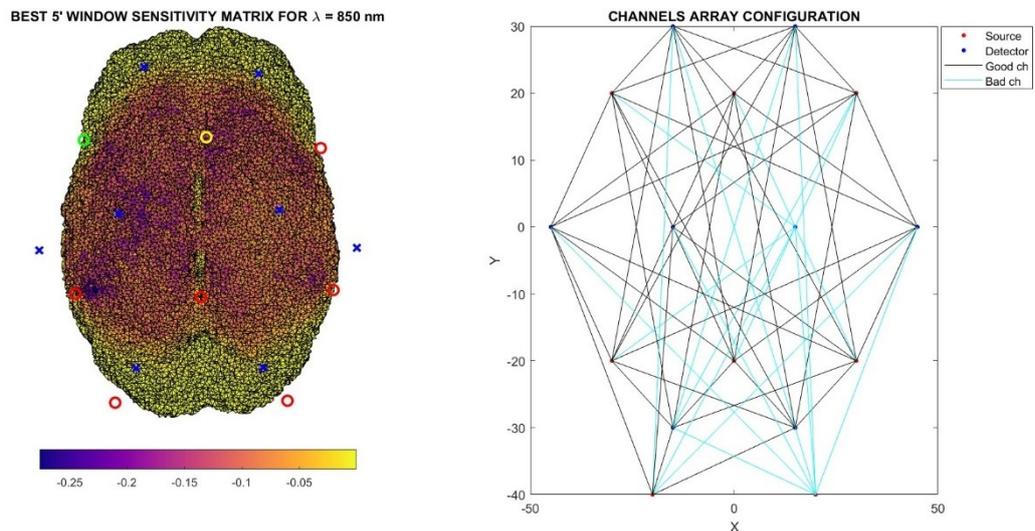


Fig. 29. A sinistra è rappresentata la matrice di sensibilità mappata sulla corteccia cerebrale per la miglior finestra identificata per il paziente 08. Si nota una buona copertura da parte dei *good channels*. A destra è riportata la configurazione dell’array, in nero i *good channels* mentre in azzurro i *bad channels* rimossi.

Al termine del processo di selezione della finestra migliore si valutano visivamente i risultati ottenuti. Se necessario, si possono modificare i valori di soglia per l’identificazione dei *bad channels* e/o dell’analisi in frequenza in modo tale da recuperare eventuali canali erroneamente rimossi. In alcuni pazienti si è riscontrato che la finestra migliore restituita dall’algoritmo

presentava un valore di SNR estremamente elevato (maggiore di 100). Ispezionando visivamente i canali appartenenti a queste finestre si è osservato che molti risultavano piatti e quindi non informativi. Questo fenomeno può essere causato da movimenti involontari della cuffia da parte degli operatori o dei genitori durante le visite al neonato, ricordando comunque che l'acquisizione NIRS dura in media alcuni giorni e che la terapia intensiva neonatale è un ambiente molto dinamico. Di conseguenza, se la prima finestra migliore è caratterizzata da un SNR troppo elevato (e irrealistico) deve essere rimossa e sostituita con la seconda. È importante sottolineare che questo approccio paziente-specifico è possibile solamente poiché il numero di pazienti all'interno del database è fortemente limitato. In caso contrario, può essere utile adottare un approccio più sofisticato di *machine learning* per identificare in maniera univoca e automatica la finestra migliore all'interno di un intervallo di euglicemia, avendo a disposizione un pool di dati più ampio.

Al termine di questa fase, si ottiene per ogni paziente la migliore finestra di cinque minuti all'interno del primo e dell'ultimo intervallo di euglicemia. Si può procedere quindi con la preelaborazione del segnale NIRS e con la correzione degli artefatti da movimento. In figura 30 sono riportati a titolo esemplificativo i tracciati NIRS della miglior finestra di 5 minuti per il paziente 08. Come si può apprezzare nel riquadro inferiore, tutti i canali che presentavano un andamento regolare sono stati correttamente rimossi dall'analisi spettrale.

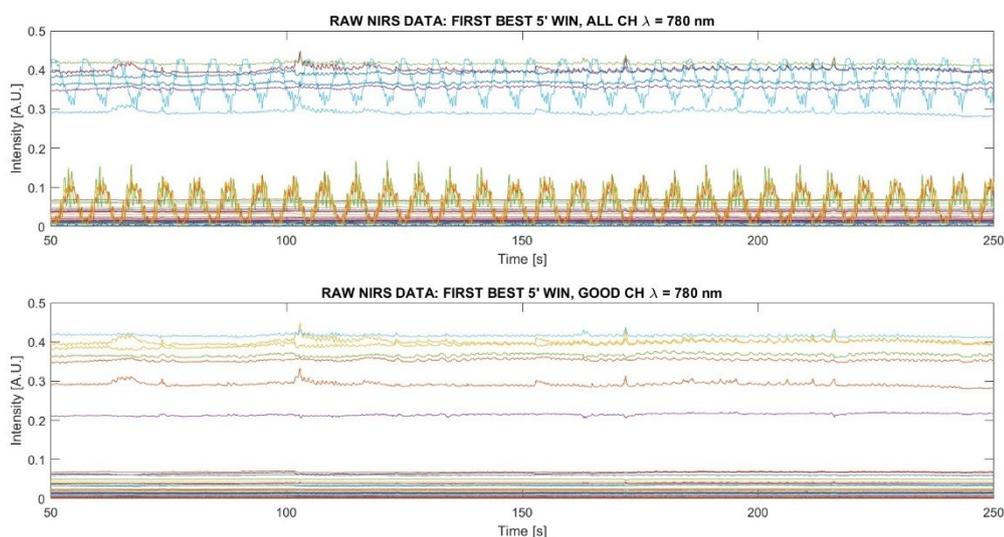


Fig. 30. Zoom dei segnali NIRS nella miglior finestra. Nella parte superiore sono rappresentati tutti i canali, si può notare l'andamento estremamente regolare di alcuni di essi. Nella parte inferiore questi canali sono stati correttamente individuati e rimossi dall'analisi spettrale.

2.4.3 Pipeline per la correzione ed elaborazione del segnale NIRS

Dopo aver ottenuto per ogni paziente la miglior finestra di cinque minuti all'interno del primo e dell'ultimo intervallo di euglicemia, si procede alla fase di *preprocessing* del segnale NIRS in modo tale da poterlo utilizzare per la ricostruzione delle immagini DOT e per la successiva analisi della connettività cerebrale funzionale a riposo. Si procede ad una conversione delle intensità acquisite tramite NIRS in densità ottiche, le quali saranno poi sottoposte ad uno step di riconoscimento e correzione di eventuali artefatti da movimento tramite filtraggio Wavelet. Infine, si applica un filtro passa banda per rimuovere il rumore fisiologico e alle alte frequenze presente nel segnale.

Per convertire il segnale intensità in densità ottiche si applica la seguente equazione:

$$OD = -\ln\left(\frac{I_2}{I_1}\right) \quad (2.3)$$

Dove I_2 corrisponde al valore assoluto dell'intensità misurata mentre I_1 rappresenta la media del segnale calcolata nel tempo.

Si procede quindi alla successiva fase di rilevazione e correzione degli artefatti da movimento in modo tale da ottenere un segnale pulito, e ridurre eventuali *bias* di connettività dovuti agli artefatti da movimento. Questo tipo di artefatti possono presentarsi sotto forma di picchi (*spikes*) o tramite variazioni a gradino del segnale (*baseline shifts*). Essi sono causati da un'alterazione dell'accoppiamento optode-scalpo dovuta principalmente a movimenti della testa o delle sopracciglia, effettuati dal soggetto durante l'acquisizione NIRS. Sebbene si possa presupporre che un neonato prematuro rimanga per la maggior parte del tempo in una posizione statica, si deve tenere in considerazione l'ambiente che lo circonda. L'acquisizione è continua e può durare per diversi giorni. In questo intervallo di tempo il neonato può essere sottoposto a procedure cliniche e può essere visitato più volte dai genitori, comportamenti che possono generare artefatti all'interno del segnale. Inoltre, poiché il cranio di un neonato molto prematuro risulta essere morbido e la fontanella non ancora chiusa, per evitare di recare dolore al paziente la cuffia NIRS deve essere posizionata gentilmente senza applicare un'eccessiva pressione. In questo modo, anche piccoli movimenti da parte del neonato possono causare un disaccoppiamento optode-scalpo, introducendo artefatti. Di conseguenza è necessario adottare un metodo in grado di correggere queste porzioni di segnale in maniera accurata.

Dopo un'attenta analisi della letteratura, si è deciso di implementare il metodo proposto da Yang et al. [75] in uno studio pubblicato a dicembre 2022 specifico per l'analisi della connettività funzionale a riposo in neonati. In particolare, questa innovativa tecnica calcola il valore di deviazione standard delle oscillazioni fisiologiche per ogni canale, escludendo le porzioni di segnale che probabilmente contengono artefatti, e la utilizza come soglia per l'identificazione degli artefatti da movimento all'interno del segnale. Successivamente, essi vengono corretti applicando in cascata la sostituzione tramite *Spline* e rumore bianco gaussiano. Sebbene come affermato dagli autori questo metodo risulta avere notevoli vantaggi nell'applicazione per lo studio della connettività funzionale a riposo in neonati, non è stato possibile applicarlo al dataset in analisi. L'identificazione degli artefatti necessita inevitabilmente di impostare in maniera arbitraria alcuni parametri che rendono più o meno rigida l'analisi. È necessario determinare l'estensione della finestra temporale entro cui verrà analizzato il tracciato, nonché stabilire una soglia per l'ampiezza e la deviazione standard al di sopra della quale la porzione di segnale analizzata verrà identificata come artefatto. È stato riscontrato che una leggera modifica di questi valori provoca notevoli cambiamenti nella matrice di connettività funzionale, non solo in termini di forza della correlazione ma anche nel pattern di correlazione ottenuto. Inoltre, poiché nei dati in analisi sono presenti numerosi *spikes* in più canali contemporaneamente, la loro sostituzione con del rumore gaussiano può alterare in maniera significativa il segnale. Infatti, è stato riscontrato che ad ogni esecuzione del codice la porzione di tracciato contenente gli artefatti individuati viene sostituita con valori randomici diversi, alterando i risultati finali. Per questo motivo si è deciso di non utilizzare questa tecnica e di impiegare un metodo di correzione basato sul filtraggio Wavelet, comunemente usato nelle analisi fNIRS, il quale consente di ottenere dei risultati stabili, accurati e riproducibili.

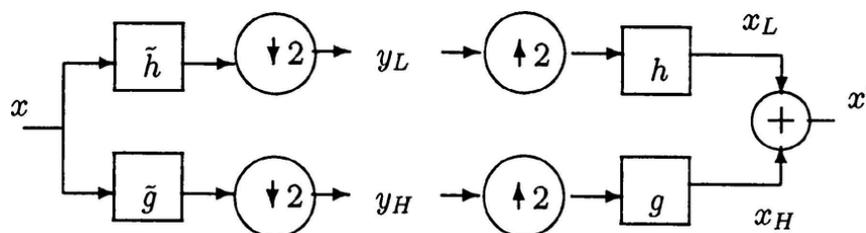


Fig. 31. Schema filtraggio alla Wavelet. I blocchi h e g corrispondono alle risposte impulsive rispettivamente del filtro passa basso e passa alto. A sinistra è descritto il procedimento per scomporre il segnale x nei coefficienti di approssimazione (y_L) e di dettaglio (y_H). A destra è riportata la trasformazione inversa che consente di ricostruire il segnale x' ripulito dagli artefatti da movimento. Preso da [76].

Il filtraggio alla Wavelet agisce a livello di singolo canale e non richiede l'identificazione a priori delle porzioni di segnale corrispondenti agli artefatti da movimento. Esso utilizza la trasformata Wavelet che consiste nell'applicare in parallelo un filtro passa alto e passa basso per scomporre il segnale rispettivamente nei coefficienti di dettaglio e di approssimazione.

Poiché gli artefatti da movimento corrispondono ad una variazione più rapida e marcata del segnale rispetto alla componente fisiologica, è ragionevole presupporre che gli *outliers* nella distribuzione dei coefficienti di dettaglio, corrispondenti alle alte frequenze, rappresentano gli artefatti. Di conseguenza, imponendo a zero il valore di tali coefficienti anomali e sfruttando la fondamentale proprietà di inversione della trasformata, è possibile ricostruire il segnale con gli artefatti attenuati od eliminati. Lo schema della procedura utilizzata è rappresentato in figura 31. Sebbene sia ampiamente dimostrato che il filtraggio alla Wavelet è in grado di correggere con precisione gli artefatti di tipo *spikes*, esso incontra difficoltà in presenza di *baseline shift*. Al termine di una ispezione visiva, si è verificato che all'interno dei segnali a nostra disposizione l'artefatto che prevale è di tipo *spike*, mentre le alterazioni della *baseline* sono limitate sia in numero che in ampiezza. Per questo motivo non ci sono particolari controindicazioni nell'utilizzo del filtraggio alla Wavelet come tecnica di correzione degli artefatti da movimento. In figura 32 e 33 sono riportati i risultati ottenuti al termine di questo step per il paziente 08 nella finestra migliore all'interno del primo intervallo di euglicemia. Come si può osservare vi è una prevalenza di *spikes*, artefatto che a livello di singolo canale viene individuato ed eliminato correttamente. A livello computazionale si è utilizzata la funzione *hmrMotionCorrectionWavelet* del pacchetto *HOMER2* nella quale l'unico parametro da settare è il valore *iqr* che corrisponde alla soglia utilizzata per rilevare gli *outliers* all'interno dei coefficienti di dettaglio. Nel caso in analisi è stato impostato un valore elevato di *iqr*, pari a 1.2, in modo tale da individuare in maniera opportuna gli artefatti ma allo stesso tempo mantenere le informazioni di nostro interesse alle basse frequenze [77].

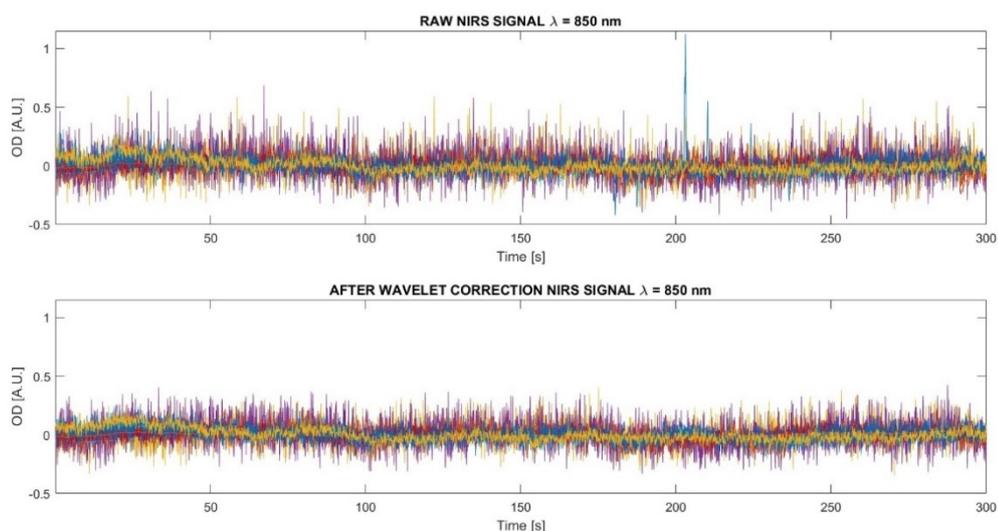


Fig. 32. Segnali NIRS prima e dopo il filtraggio alla Wavelet. Nella parte inferiore si può osservare la corretta attenuazione e rimozione degli spikes corrispondenti agli artefatti da movimento presenti all'interno del tracciato NIRS grezzo. Inoltre, il segnale non è stato alterato e non sono presenti *baseline shift*.

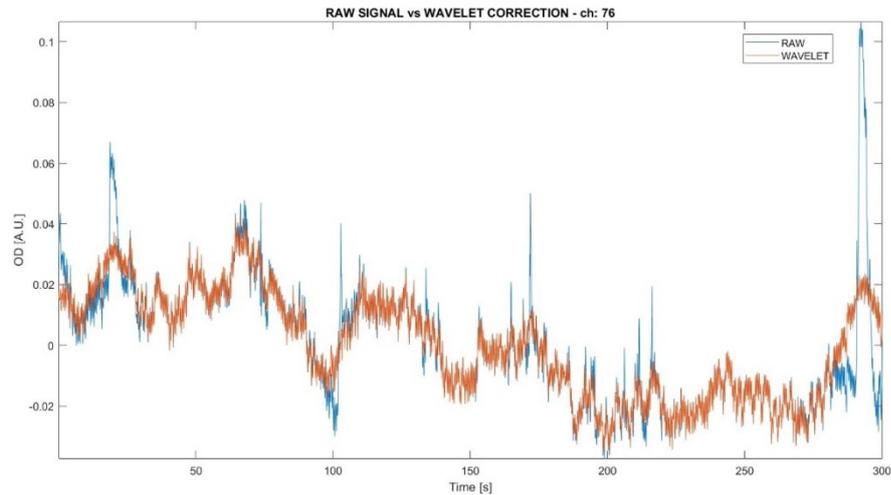


Fig. 33. Segnale grezzo (blu) di un singolo canale a confronto con la sua correzione tramite filtraggio Wavelet (arancio). Si osserva che i picchi più pronunciati sono stati correttamente attenuati ottenendo un tracciato privo di artefatti da movimento di tipologia spikes.

Dopo aver rimosso gli eventuali artefatti da movimento, si applica un filtro passa banda in modo tale da eliminare il rumore fisiologico e alle alte frequenze presente all'interno del segnale. L'utilizzo di un filtro passa basso consente di rimuovere le componenti ad alta frequenza relative all'attività cardiaca e al rumore di strumentazione, mentre il filtro passa alto sopprime le basse frequenze corrispondenti a *drift* strumentali, provocati ad esempio dal calore emesso dalla luce laser. Per eseguire questo step è stata utilizzata la funzione *hmrBandpassFilter* del pacchetto *HOMER2* impostando 0.009 Hz e 0.8 Hz come frequenze di *cutoff*. Come suggerito in uno studio sulla connettività cerebrale a riposo effettuato da Mesquita et al. [78], questi valori sono in grado di attenuare sufficientemente la componente vascolare dei tessuti extracerebrali che inevitabilmente contamina il segnale acquisito dal rilevatore posto sullo scalpo. In figura 34, sono riportati i risultati ottenuti dal filtraggio passa banda per il paziente 08 nella miglior finestra all'interno del primo intervallo di euglicemia.

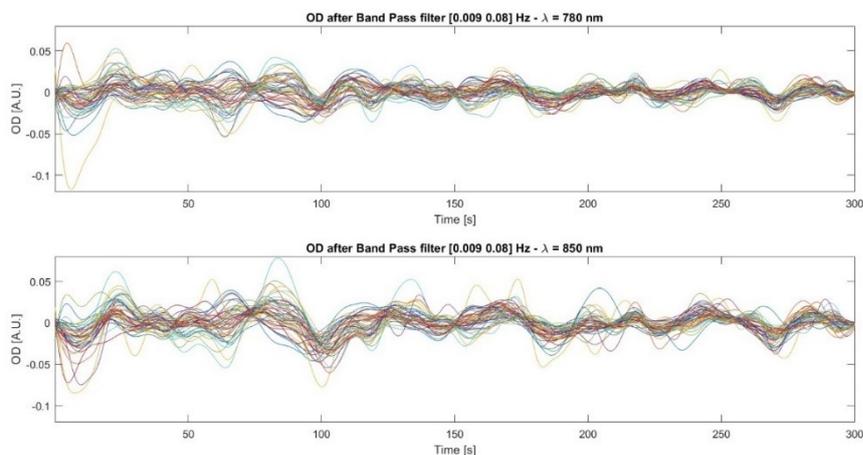


Fig. 34. Segnale NIRS ottenuto dal filtraggio passa banda. Sono conservate solamente le frequenze considerate informative per calcolare la funzionalità cerebrale a riposo.

Nonostante la fase di preelaborazione sia di fondamentale importanza per ottenere dei segnali il più possibile privi di artefatti, è di pari interesse modificare il meno possibile i dati per evitare di introdurre *bias* nei risultati. Per questo motivo, è stata posta particolare attenzione nell'attuare step di correzione del segnale che garantiscono un adeguato compromesso tra bontà dei risultati e riproducibilità del metodo impiegato.

2.4.4 Ricostruzione delle immagini DOT

Dopo aver ottenuto il segnale privo di artefatti da movimento e rumore fisiologico, si è passati alla ricostruzione delle immagini DOT attraverso la soluzione del problema inverso. Al termine di questa fase si ottiene il valore della concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata per ogni istante temporale e nodo che compone la *mesh*.

Per risolvere il problema inverso vengono ricostruite le immagini come variazione del coefficiente di assorbimento ($\Delta\mu_{a|\lambda i}$, equazione 2.4) e, tramite l'inversione della legge di Beer-Lambert modificata (equazione 2.5), si ottiene il segnale variazione di concentrazione per HbO e HbR.

$$\Delta\mu_{a|\lambda i} = J_{\lambda i}^{-1} * \Delta OD_{\lambda i} \quad (2.4)$$

$$\begin{cases} \Delta\mu_{a|\lambda 1} = \tilde{\mu}_{HbO|\lambda 1} \Delta C_{HbO} + \tilde{\mu}_{HbR|\lambda 1} \Delta C_{HbR} \\ \Delta\mu_{a|\lambda 2} = \tilde{\mu}_{HbO|\lambda 2} \Delta C_{HbO} + \tilde{\mu}_{HbR|\lambda 2} \Delta C_{HbR} \end{cases} \quad (2.5)$$

dove $\Delta\mu_{a|\lambda i}$ sono le immagini ricostruite come variazione del coefficiente di assorbimento per una specifica lunghezza d'onda, J la matrice Jacobiana di sensitività in relazione alla lunghezza d'onda λ in analisi, $\tilde{\mu}$ è il coefficiente specifico di assorbimento e ΔC il vettore delle variazioni di concentrazione. Il coefficiente specifico di assorbimento per i due cromofori HbO e HbR alle due lunghezze d'onda si ottiene utilizzando la funzione *GetExtinctions* del pacchetto *HOMER2*. Si deve prestare particolare attenzione all'unità di misura dei valori restituiti da tale funzione; è necessaria una conversione da M*L/cm in $\mu\text{M}*\text{L}/\text{mm}$. Poiché la matrice di sensitività J non è quadrata, il problema inverso risulta: indeterminato, mal posto e mal condizionato. Ciò significa che il numero di incognite supera il numero di osservazioni, non esiste una soluzione unica e il rumore presente nel segnale in ingresso viene amplificato significativamente. Per evitare questo tipo di problemi, si calcola l'inversa utilizzando la regolarizzazione di Tikhonov.

Essa consente di effettuare un compromesso tra l'abilità di spiegare fedelmente i dati e di ottenere una stima regolare del segnale. La sua formulazione è la seguente:

$$J^{-1} \approx \Sigma_u J^T (J \Sigma_u J^T + \Sigma_v \lambda) \quad (2.6)$$

$$\lambda = \lambda_1 * \max(S); \text{ con } S = \text{svd}(J * J^T) \quad (2.7)$$

dove λ è il parametro di regolarizzazione, Σ_u la matrice di covarianza del modello, Σ_v la matrice di covarianza delle misure. In riferimento al parametro di regolarizzazione, esso può essere calcolato tramite l'equazione 2.7 con λ_1 posto uguale a 0.1. Per quanto riguarda Σ_u e Σ_v sono state impostate entrambe come matrici identità. Nel primo caso non è necessario fornire alcun *prior* sul modello utilizzato poiché si vogliono ottenere solamente le concentrazioni di HbO ed HbR, con la stessa unità di misura e unità di grandezza molto simile. Per quanto riguarda i *prior* contenuti in Σ_v , anche in questo caso sono stati impostati come identità poiché si può presupporre che al termine del *preprocessing* i dati sono caratterizzati da un livello di rumorosità omogeneo. Nel caso in cui si dovesse utilizzare questo approccio in applicazioni *real time*, dove non è possibile effettuare un rigoroso processo di rimozione del rumore, sarebbe opportuno impostare questa matrice con una stima della covarianza dell'errore di misura.

Al termine di questa operazione, per ogni istante temporale acquisito, si ottengono i valori di concentrazione dell'emoglobina ossigenata e deossigenata per ciascun nodo della *mesh* volumetrica. Poiché si è interessati a valutare le variazioni di HbO e HbR sulla corteccia cerebrale, è stata creata una matrice di trasferimento in grado di mappare sulla superficie della materia grigia i valori ottenuti in riferimento alla *mesh* tridimensionale. A tal proposito, la concentrazione attribuita ad un nodo della *mesh* corticale corrisponde alla media delle misure appartenenti ai nodi della *mesh* tetraedrica che rientrano in una sfera di raggio 3 mm.

Ottenuti i valori di variazione di concentrazione di HbO e HbR sulla corteccia cerebrale per ogni istante temporale della migliore finestra di euglicemia, si può considerare conclusa la fase di elaborazione del segnale NIRS. Nel prossimo paragrafo verranno riportati i passaggi impiegati per il calcolo della *Resting State Functional Connectivity*.

2.5 ANALISI DELLA *RESTING STATE FUNCTIONAL CONNECTIVITY*

In questo paragrafo verrà descritto il procedimento adottato per calcolare la *Resting State Functional Connectivity* con approccio *seed based*. Per ciascun paziente si otterranno un totale di 4 matrici di connettività in riferimento all'emoglobina ossigenata e deossigenata all'interno della miglior finestra identificata nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia. Si procederà all'estrazione di una metrica emodinamica basata sulla variazione della connettività cerebrale sperimentata dal paziente all'interno dell'intervallo di acquisizione dei dati.

2.5.1 Definizione delle *Region Of Interest*

Per poter procedere al calcolo della rsFC con il metodo *seed based* è necessario definire in maniera formale le regioni di interesse (*Region Of Interest*, ROI). Data la mancanza di un approccio standard in letteratura, si è deciso di creare delle ROI circolari di raggio 15 mm con centro la posizione corticale dei punti definiti dal sistema internazionale 10-20 utilizzato nell'EEG. Tale protocollo consente di posizionare il centro delle ROI nei 21 punti identificati suddividendo il cranio del soggetto in parti uguali utilizzando come riferimento il *nasion*, l'*inion* e i punti preauricolari. Il nome di ogni posizione 10-20 è composto da una lettera e da un numero. La lettera si riferisce alla regione del cervello dov'è posizionata (F: Frontale, C: Centrale, T: Temporale, P: Posteriore, O: Occipitale), mentre il numero si riferisce all'emisfero di appartenenza (numeri pari emisfero destro, numeri dispari emisfero sinistro) [79]. In figura 35 è riportata la disposizione dei punti del sistema internazionale 10-20.

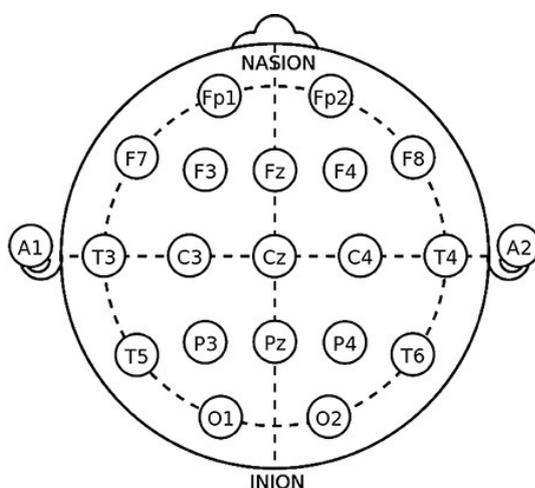


Fig. 35. Distribuzione dei punti sullo scalpo secondo il sistema internazionale 10-20. Preso da [79].

Il centro della ROI sulla corteccia cerebrale corrisponde al nodo della relativa *mesh* spazialmente più vicino alla posizione del sistema 10-20 nello scalpo. Prima di procedere all'estrazione del segnale per ogni ROI, è necessario verificare se essa è sufficientemente sensibile all'array NIRS utilizzato. Come riportato nel paragrafo 2.4.2, un nodo si definisce sensibile se il suo livello di sensibilità all'array utilizzato è maggiore del valore "*Coverage Threshold*". Poiché la sensibilità della corteccia cerebrale varia in base alla configurazione dei *good channels* all'interno della migliore finestra selezionata, tale procedura di selezione delle ROI deve essere ripetuta individualmente per tutti i pazienti dello studio. Per ogni paziente analizzato, solamente 9 ROI su 21 sono considerate sufficientemente sensibili e possono essere utilizzate per calcolare la connettività cerebrale. Queste regioni di interesse corrispondono alle posizioni 10-20: F3, Fz, F4, C3, Cz, C4, P3, Pz e P4. La loro posizione proiettata sulla superficie della corteccia cerebrale è raffigurata in figura 36 per un paziente con età gestazionale di 31 settimane. Da come si può osservare, le ROI escluse corrispondono alle porzioni di encefalo dove non sono state posizionate sorgenti NIRS per non recare disturbo al neonato (lobo frontale, occipitale e temporale).

Definito il centro, si costruiscono le ROI raggruppando tutti i nodi che sono presenti all'interno di un cerchio di raggio 15 mm. È necessario un ultimo controllo prima di procedere all'estrazione del segnale medio per ogni regione di interesse. Si deve valutare se all'interno di una regione di interesse i nodi sensibili sono almeno un terzo del numero totale. Le ROI che non superano questa fase sono eliminate dall'analisi, in maniera individuale per ogni paziente, in quanto non sono sufficientemente sensibili alla configurazione dei canali buoni rimasta dopo la scrematura iniziale. Poiché le varie finestre migliori di euglicemia hanno un numero diverso di canali attivi, si deve ripetere questa analisi per ogni paziente in analisi. Su 9 pazienti, solo il numero 14 presenta 2 ROI escluse (F3 e Fz). In figura 37 sono riportate le distribuzioni delle ROI sulla corteccia cerebrale nei due casi sopracitati.

Definite le ROI si procede all'estrazione del segnale medio. Si calcola la media dei valori di concentrazione di HbO ed HbR tra tutti i nodi appartenenti alla ROI per ciascun istante temporale. Al termine di questa operazione, per ogni paziente si ottengono i segnali HbO ed HbR di ciascuna ROI per la finestra migliore selezionata all'interno del primo ed ultimo intervallo di euglicemia.

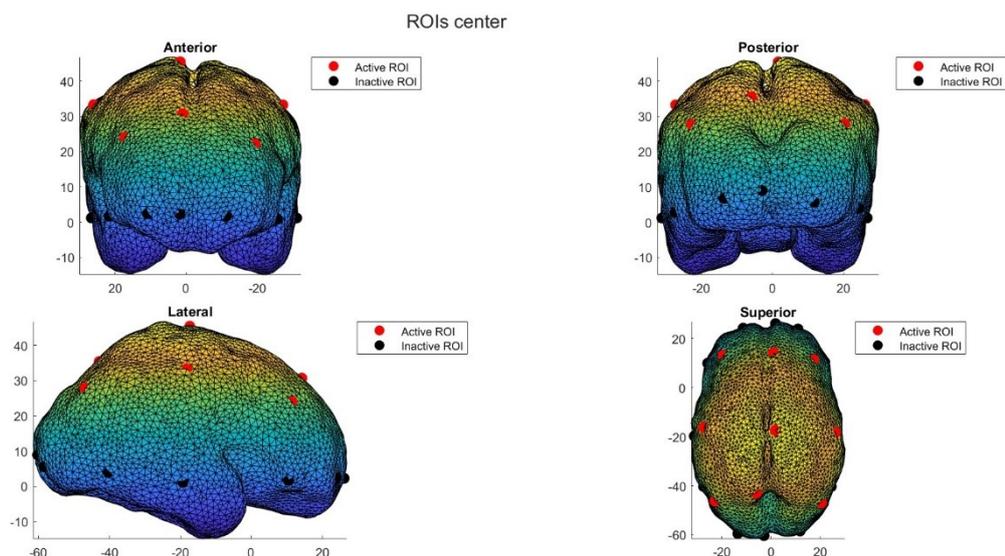


Fig. 36. Distribuzione dei centri delle ROI sulla corteccia cerebrale. In rosso sono rappresentati i centri delle ROI con nodi sufficientemente sensibili, cioè quelli con un valore di sensibilità maggiore della Coverage Threshold. Viceversa, in nero sono riportati i nodi non sufficientemente coperti dall'array dei canali utilizzato e che per tale motivo devono essere esclusi dall'analisi.

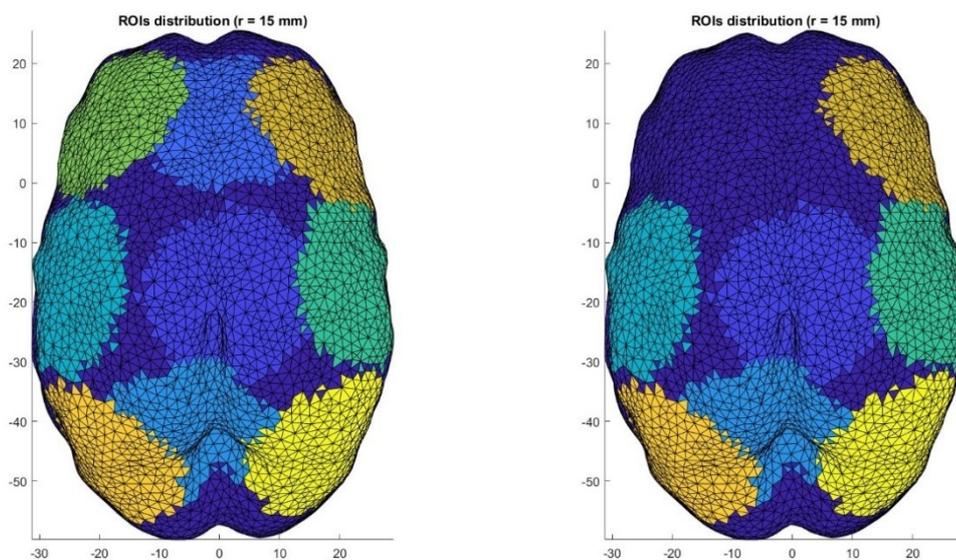


Fig. 37. Distribuzione delle ROI sulla corteccia cerebrale. A sinistra è rappresentata la disposizione corrispondente ad un paziente che presenta tutte le ROI sensibili. A destra è riportata la configurazione relativa al paziente numero 14, l'unico paziente che contiene due ROI non sufficientemente sensibili all'array dei good channels della miglior finestra individuata.

2.5.2 Calcolo della *Resting State Functional Connectivity*

Ottenuti i segnali di variazione di concentrazione HbO e HbR per ogni ROI, si procede al calcolo della matrice di connettività cerebrale funzionale a riposo.

La *Resting State Functional Connectivity* consente di descrivere le interazioni tra regioni cerebrali separate in condizioni di riposo. Attraverso il comando *corr* di MATLAB si calcola la correlazione di Pearson tra il segnale di ogni ROI con quello delle altre regioni di interesse definite nel paragrafo precedente. In uscita alla funzione si ottiene il coefficiente di correlazione r con il relativo grado di significatività statistica (p -value) per ciascuna coppia di ROI. Il coefficiente di Pearson è definito come il rapporto tra la covarianza di due processi aleatori e il prodotto della loro deviazione standard (equazione 2.8). Poiché si ha a disposizione un numero limitato di misure, tale valore può essere approssimato applicando l'equazione 2.9.

$$\rho_{w,z} = \frac{cov(w, z)}{\sqrt{var(w) * var(z)}} \quad (2.8)$$

$$r_{w,z} = \frac{\sum_{i=1}^N (w_i - \bar{w}) * (z_i - \bar{z})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (w_i - \bar{w})^2 * \sum_{i=1}^N (z_i - \bar{z})^2}} \quad (2.9)$$

Nell'equazione 2.8, $\rho_{w,z}$ corrisponde alla misura normalizzata della dipendenza lineare tra i due processi aleatori w e z . Nell'equazione 2.9, N corrisponde al numero di campioni, mentre \bar{w} e \bar{z} indicano la media dei rispettivi processi aleatori [80]. Nel caso in analisi w e z indicano il segnale di variazione di concentrazione temporale di HbO od HbR estratto per ogni ROI.

La funzione *corr* consente anche di calcolare il livello di significatività del coefficiente di correlazione. Tale valore definisce la probabilità che l'ipotesi nulla sia vera, cioè che la correlazione non sia statisticamente significativa. Il p -value è calcolato utilizzando la distribuzione t di Student. Poiché si effettuano test multipli è opportuno correggere la soglia di significatività *alfa*. Questo step è necessario poiché aumentando il numero di confronti aumenta la probabilità di commettere un errore di tipo 1, cioè quando si rifiuta erroneamente l'ipotesi nulla. In questo caso si affermerebbe che la correlazione è significativa quando nella realtà non lo è. La correzione per confronti multipli viene effettuata utilizzando il metodo di Bonferroni, il quale definisce la nuova soglia di significatività tramite l'equazione 2.10.

$$\alpha_{bonf} = \frac{\alpha}{nc} \quad (2.10)$$

dove α_{bonf} è il livello di significatività corretto, α corrisponde al livello di significatività iniziale selezionato (0.05) mentre nc è il numero di confronti effettuati. Di conseguenza la matrice di significatività viene creata ponendo a 0 la cella per cui il p -value è minore del valore di α_{bonf} appena calcolato. Si otterrà quindi una matrice binarizzata nella quale vengono evidenziate le correlazioni tra coppie di ROI statisticamente significative.

In questo modo vengono calcolate le matrici di connettività funzionale di HbO ed HbR per ogni paziente e per ognuna delle finestre di cinque minuti individuate all'interno del primo ed ultimo intervallo di euglicemia. In figura 38 sono riportati a titolo esemplificativo i risultati ottenuti per il paziente numero 08 nella miglior finestra all'interno del primo intervallo di euglicemia. In particolare, le celle della matrice rsFC caratterizzate da un colore caldo rappresentano le coppie di ROI che presentano una correlazione positiva. In questo caso i segnali di entrambe le regioni aumentano o diminuiscono in maniera concorde. Viceversa, una cella con colore freddo indica una correlazione negativa; i segnali delle due regioni variano con segno negativo.

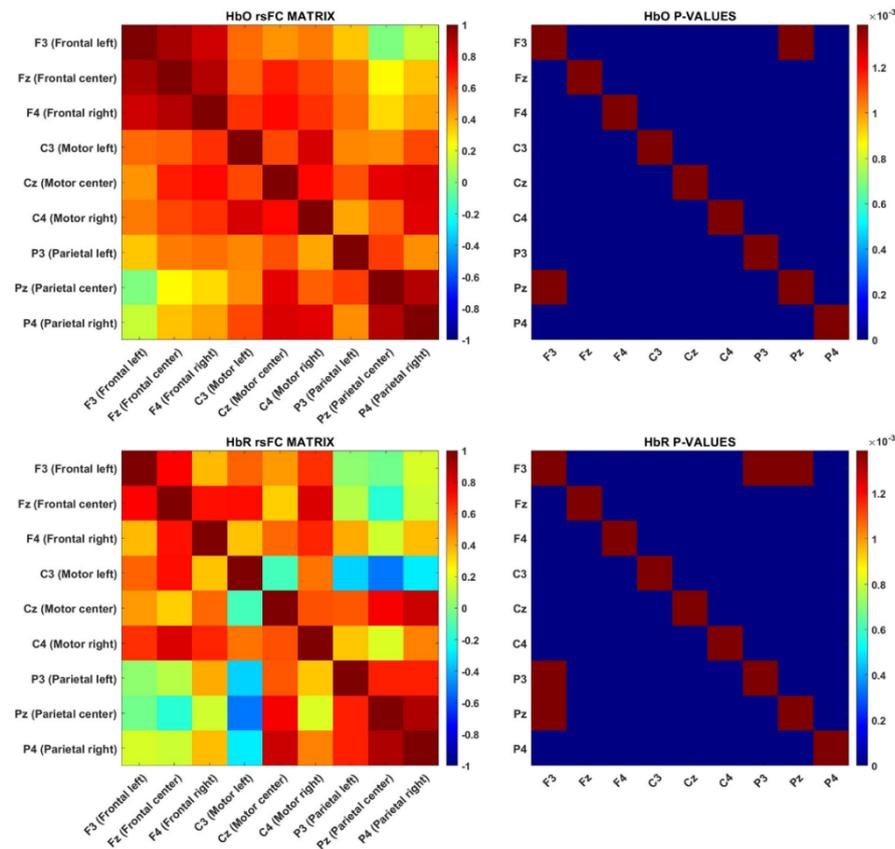


Fig. 38. Matrici di rsFC per il paziente 08. In riferimento alla matrice del p -value, le celle di colore blu corrispondono alle correlazioni statisticamente significative ottenute dopo la correzione per confronti multipli di Bonferroni ($\alpha_{bonf} = 0.0014$).

2.5.3 Definizione delle metriche emodinamiche

Si procede alla definizione delle metriche emodinamiche in grado di riassumere la variazione della connettività cerebrale a riposo che avviene ai due estremi dell'acquisizione. A tal proposito si è deciso di calcolare la differenza tra i valori di correlazione per coppie di ROI ottenuti nella prima ed ultima finestra di euglicemia. Questa procedura viene applicata separatamente con i risultati ottenuti per l'emoglobina ossigenata e deossigenata. Si ottiene dunque una metrica che può essere utilizzata per valutare se la variabilità glicemica sperimentata dal paziente durante l'intervallo di acquisizione dei dati ha contribuito a provocare una variazione significativa nella connettività cerebrale.

Dal punto di vista computazionale, per ogni matrice di connettività corrispondente al primo ed ultimo intervallo di euglicemia è stata applicata la trasformazione Z di Fisher. Questo passaggio è fondamentale in quanto è stato dimostrato che la distribuzione dei coefficienti di Pearson è altamente asimmetrica per variabili correlate con un numero limitato di campioni. La trasformata Z di Fisher è uno strumento statistico che risulta essere particolarmente efficace per questa tipologia di correlazione e che consente di ottenere un nuovo pool di dati con distribuzione normale e varianza indipendente [81]. Successivamente, si sono estratti i valori normalizzati corrispondenti alla porzione triangolare superiore della matrice simmetrica di correlazione ed è stata effettuata la sottrazione tra i due intervalli di euglicemia. Applicando questo algoritmo per ogni paziente e per ogni cromoforo si ottengono due matrici con un numero di colonne pari al numero di pazienti e numero di righe il numero di confronti effettuati tra ROI, nel caso in analisi [9 x 36].

2.6 CORRELAZIONE TRA EVENTI GLICEMICI E *RESTING STATE FUNCTIONAL CONNECTIVITY*

In questo paragrafo verranno elencati i metodi statistici applicati per valutare la presenza di correlazione tra le metriche glicemiche e le variazioni della connettività cerebrale a riposo.

Le metriche glicemiche definite nel paragrafo 2.2.4 sono caratterizzate da unità di misura diverse e risulta quindi necessario applicare un processo di Z-score per renderle confrontabili. Per selezionare il metodo di correlazione più efficace è fondamentale verificare se tali variabili derivano da una distribuzione gaussiana utilizzando il Lilliefors test. Nonostante i pochi dati a disposizione, l'analisi ha riscontrato che le metriche relative a *SD*, *MAD*, *iqr*, *MODD*, *TIR%* e *TOR%* non seguono una distribuzione normale.

Poiché una delle ipotesi fondamentali della correlazione alla Pearson risiede nella normalità dei dati, si è deciso di implementare il metodo non parametrico per ranghi di Spearman. Tale approccio consente di calcolare la relazione tra due misure, richiedendo come unica ipotesi che provengano da variabili ordinali. A differenza della correlazione alla Pearson che valuta una relazione di tipo lineare, Spearman definisce il grado di dipendenza tra due misure facendo riferimento al loro rango e ad una qualsiasi funzione monotona [82]. La chiave di lettura dei risultati è la stessa per entrambe le metodologie ed è riportata nel paragrafo 2.5.2. Anche in questo caso è stata utilizzata una distribuzione t di Student per valutare la significatività.

Poiché si calcola la correlazione tra il valore di rsFC di una coppia di ROI con l'intera matrice delle metriche glicemiche è importante effettuare una correzione per confronti multipli. Poiché il metodo di Bonferroni è noto per essere particolarmente rigido, si sono valutati i risultati ottenuti utilizzando diverse strategie di correzione. Il metodo iterativo di Holm-Bonferroni risulta essere leggermente meno conservativo in quanto valuta la significatività dei risultati analizzando la struttura dei *p-value* in base al loro rango. Nonostante sia computazionalmente più lento rispetto a Bonferroni, è caratterizzato da una maggiore potenza statistica nel rilevare con precisione gli errori di tipo I (falsi positivi) [83]. È stato inoltre implementato il metodo *False Discovery Rate* (FDR) il quale risulta essere meno restrittivo ma allo stesso tempo più potente garantendo la riduzione del numero di errori di tipo II (falsi negativi) e mantenendo sotto controllo gli errori di tipo I (falsi positivi). In particolare, è stata adottata la strategia proposta da Benjamini & Yekutieli poiché garantisce un'adeguata accuratezza dei risultati a prescindere dalla distribuzione delle variabili in analisi [84]. È utile sottolineare che si sono ottenuti gli stessi risultati per ciascun metodo di correzione testato.

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 REPORT SULL'ATTIVITÀ GLICEMICA

3.1.1 Risultati dell'analisi glicemica

L'algoritmo automatico di analisi glicemica progettato in questa tesi consente di tracciare un dettagliato profilo glicemico per ogni paziente presente all'interno del database. Si ottiene quindi un grafico contenente il tracciato CGM dove si evidenziano con un codice colore le aree corrispondenti ad un evento glicemico o ad un intervallo di euglicemia. L'algoritmo consente anche di evidenziare gli eventi esclusi dall'analisi, nei quale è presente un gap temporale. In questo modo il profilo glicemico del paziente risulta essere di facile interpretazione e si può effettuare una prima analisi qualitativa del segnale CGM. Oltre alla rappresentazione grafica, il codice riporta sulla *Command Window* di MATLAB alcune informazioni specifiche derivate da questo studio. In particolare, per ogni evento glicemico rilevato l'algoritmo ne indica la tipologia e ne calcola la durata, specificando l'istante temporale di inizio e di fine. È riportato anche uno spazio dedicato al *flag* nel quale si può evidenziare se un evento è considerato critico oppure se il suo inizio o la sua fine sono al di fuori dell'intervallo di acquisizione CGM. Inoltre, sono stati calcolati anche alcuni parametri in grado di riassumere la variabilità glicemica all'interno del singolo evento. Allo stesso modo vengono rappresentati i risultati per l'analisi degli intervalli di euglicemia.

Di seguito verrà brevemente analizzato a scopo illustrativo il profilo glicemico relativo al paziente numero 36. In figura 39 è riportata la rappresentazione grafica ottenuta tramite l'algoritmo. Si può notare la presenza di 8 eventi glicemici. Il primo contiene un gap critico; non potendo prevedere in maniera accurata cosa accade durante il periodo di mancanza di segnale, esso viene escluso dal proseguimento dell'analisi. Da come si può osservare, l'ultimo campione acquisito è ancora abbondantemente al di sotto del limite inferiore del range di euglicemia. Il sensore CGM è stato rimosso durante un evento glicemico e di conseguenza non

è possibile rilevarne la fine. Poiché non si dispongono di tutte le informazioni relative a tale evento, non è possibile descriverlo con precisione e per questo motivo viene eliminato. In definitiva, l’algoritmo rileva 6 eventi completi (4 ipoglicemie moderate e 2 iperglicemie moderate) e 2 eventi rimossi (gap critico ed evento finale). Per quanto riguarda l’analisi dell’euglicemia, l’algoritmo ha rilevato 9 intervalli dove il segnale è in *baseline* e la presenza di due gap critici rimossi. In figura 40 viene riportato un esempio di come vengono rappresentati i risultati sulla *Command Window*.

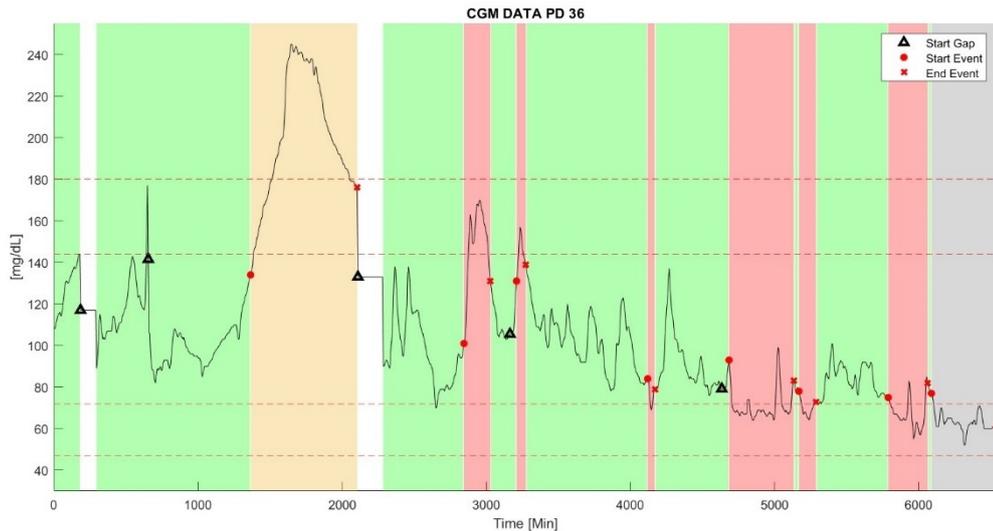


Fig. 39. Rappresentazione grafica tracciato CGM riferito al paziente numero 36. Le aree evidenziate in verde corrispondono agli intervalli di euglicemia mentre quelle in rosso rappresentano gli eventi glicemici. In giallo è contrassegnato l’unico evento contenente un gap critico mentre in grigio l’ipoglicemia la cui fine non è stata acquisita all’interno della rilevazione CGM. Questi ultimi due eventi sono stati correttamente rimossi dall’analisi glicemica. Infine, le aree bianche corrispondono ai gap critici presenti all’interno degli intervalli di euglicemia.

EVENT ANALYSIS											
#	flag	date_start	date_end	duration	type	max	min	range	mean	median	std
1	1	20-Oct-2021 17:53:00	21-Oct-2021 06:13:00	740	"Severe Hyper"	245	145	100	203	198	28.649
2	0	22-Oct-2021 18:33:00	22-Oct-2021 21:38:00	185	"Mild Hyper"	170	149	21	160	159	7.0785
3	0	23-Oct-2021 00:38:00	23-Oct-2021 01:43:00	65	"Mild Hyper"	157	145	12	151	151.5	4.761
4	0	23-Oct-2021 15:48:00	23-Oct-2021 16:38:00	50	"Mild Hypo"	71	69	2	70	70	1
5	0	24-Oct-2021 01:13:00	24-Oct-2021 08:43:00	450	"Mild Hypo"	99	64	35	70	68	6.867
6	0	24-Oct-2021 09:18:00	24-Oct-2021 11:18:00	120	"Mild Hypo"	71	64	7	68	67	2.154
7	0	24-Oct-2021 19:38:00	25-Oct-2021 00:13:00	275	"Mild Hypo"	83	55	28	65	65	5.9322
8	2	25-Oct-2021 00:38:00	25-Oct-2021 08:13:00	455	"Mild Hypo"	71	52	19	63	62	3.683

EUGLYCEMIA ANALYSIS										
#	date_start	date_end	duration	max	min	range	mean	median	std	
1	19-Oct-2021 19:08:00	19-Oct-2021 22:08:00	180	144	108	36	127	130	11.44	
2	20-Oct-2021 00:03:00	20-Oct-2021 17:48:00	1065	177	82	95	106	105	14.955	
3	22-Oct-2021 09:13:00	22-Oct-2021 18:28:00	555	138	70	68	98	94.5	17.003	
4	22-Oct-2021 21:43:00	23-Oct-2021 00:33:00	170	128	103	25	110	107	7.4565	
5	23-Oct-2021 01:48:00	23-Oct-2021 15:43:00	835	136	78	58	103	103.5	13.262	
6	23-Oct-2021 16:43:00	24-Oct-2021 01:08:00	505	137	76	61	90	85	13.456	
7	24-Oct-2021 08:48:00	24-Oct-2021 09:13:00	25	81	77	4	79	79	1.4142	
8	24-Oct-2021 11:23:00	24-Oct-2021 19:33:00	490	101	72	29	84	84	7.3002	
9	25-Oct-2021 00:18:00	25-Oct-2021 00:33:00	15	80	78	2	79	78.5	0.95743	

Fig. 40. Esempio di rappresentazione dei risultati sulla *Command Window* di MATLAB. L’unità di misura per “duration” è minuti mentre per “max”, “min”, “range”, “mean”, “median” e “std” è [mg/dL].

# PD	EVENTI	RIMOSSI	IPO_M	IPO_S	IPER_M	IPER_S	IPO/IPER
1	6	4	0	0	2	0	0
2	3	2	0	0	1	0	0
3	1	0	0	0	1	0	0
4	10	0	3	1	5	1	0
5	12	1	7	0	3	1	0
6	8	2	0	0	6	0	0
7	23	0	21	0	2	0	0
8	11	0	11	0	0	0	0
9	12	1	2	0	8	1	0
10	1	0	1	0	0	0	0
11	2	0	1	0	1	0	0
12	2	1	0	0	0	1	0
13	8	1	7	0	0	0	0
14	6	1	0	0	2	2	1
15	11	1	8	2	0	0	0
16	5	1	0	0	3	1	0
17	4	0	0	0	0	2	2
19	7	1	0	1	5	0	0
20	14	2	12	0	0	0	0
22	2	2	0	0	0	0	0
23	1	0	0	0	1	0	0
24	4	1	0	0	2	1	0
25	6	0	5	1	0	0	0
26	11	3	0	0	7	1	0
28	3	2	1	0	0	0	0
33	21	4	14	3	0	0	0
34	4	3	0	1	0	0	0
35	15	1	2	0	12	0	0
36	8	2	4	0	2	0	0
37	17	3	0	0	10	4	0
38	14	3	8	2	1	0	0
39	2	1	1	0	0	0	0
40	2	1	0	0	1	0	0
41	5	1	4	0	0	0	0
42	14	0	0	0	10	4	0
43	10	2	1	0	6	1	0
44	2	1	1	0	0	0	0
45	2	0	2	0	0	0	0
47	8	0	5	0	3	0	0
48	2	0	2	0	0	0	0
49	37	7	26	4	0	0	0
50	6	0	0	0	4	2	0
51	18	1	1	0	13	2	1
52	20	1	18	0	0	1	0
53	8	2	0	0	5	1	0
54	2	1	1	0	0	0	0
55	9	2	7	0	0	0	0

Tab. 3. Tabella riassuntiva finale contenente il numero e la classificazione di ogni evento glicemico rilevato nei pazienti a disposizione all'interno del database. IPO_M = ipoglicemie moderate, IPO_S = ipoglicemie severe, IPER_M = iperglicemie moderate, IPER_S = iperglicemie severe, IPO/IPER = eventi in cui vi sono sia picchi ipoglicemici che iperglicemici.

# PD	EU INT	DUR. TOT [min]	MEDIANA [min]	MAD [min]	MAX [min]	MIN [min]	GAP RIMOSSI
1	5	2380	165	85	1950	15	1
2	4	5165	400	270	4320	45	2
3	2	6375	3188	1388	4575	1800	0
4	11	4360	320	285	1060	10	0
5	13	3660	160	100	840	10	0
6	7	3565	75	50	2515	5	0
7	24	2090	43	30	260	0	0
8	12	4385	230	103	1160	65	0
9	10	3405	90	63	1315	20	0
10	2	3275	1638	113	1750	1525	0
11	3	1065	380	100	480	205	0
12	3	1970	260	45	1495	215	1
13	7	4145	190	160	2010	30	0
14	5	1020	165	125	590	30	0
15	11	3115	65	55	885	10	0
16	5	4255	295	160	2385	135	1
17	5	3000	500	480	1255	20	0
19	7	3185	345	235	1660	5	0
20	14	6735	335	190	1290	60	1
22	4	3435	695	625	1975	70	1
23	6	4065	438	268	2265	30	2
24	4	1390	40	25	1310	0	0
25	7	4970	715	485	1310	5	0
26	11	2360	170	80	400	20	0
28	4	855	223	143	370	40	1
33	25	2215	95	35	315	0	5
34	3	205	85	30	115	5	0
35	17	5140	245	130	905	5	2
36	9	3840	490	320	1065	15	2
37	16	1495	73	43	355	0	1
38	16	4686	83	50	2161	10	1
39	3	625	240	35	275	110	1
40	3	3905	640	460	3085	180	1
41	5	4445	380	335	2440	45	0
42	14	1805	48	40	480	5	2
43	13	2430	55	30	730	10	3
44	3	2185	535	425	1540	110	1
45	5	1970	385	355	920	5	2
47	7	6096	345	135	2630	15	0
48	5	2560	395	220	1345	160	2
49	33	1865	40	25	225	0	4
50	8	2105	150	120	930	10	1
51	20	3165	105	78	455	10	2
52	22	5986	163	121	1130	10	1
53	9	1550	120	50	605	0	1
54	3	565	180	60	265	120	1
55	11	6230	520	335	1730	15	3

Tab. 4. Tabella riassuntiva finale sull'analisi degli intervalli di euglicemia per ogni paziente presente all'interno del database a disposizione. EU INT = numero di intervalli rilevati, DUR. TOT = Durata totale dell'intervallo, MAD = Median Absolute Deviation.

Nella tabella 3 sono riportati i risultati riassuntivi dell'analisi glicemica effettuata per ogni paziente presente all'interno del database. Si può osservare il numero di eventi rilevati classificati per ciascuna categoria e il numero di eventi rimossi per la presenza di gap temporali critici o poiché non completamente rilevati all'interno dell'acquisizione. Nella tabella 4 sono rappresentati i risultati ottenuti al termine dell'analisi degli intervalli di euglicemia. In particolare, è riportato il numero di intervalli rilevati e alcune informazioni utili a descriverne l'estensione temporale come la durata totale, la mediana, la Mean Absolute Deviation (MAD), durata massima, minima e il numero di gap critici rimossi secondo il criterio descritto nel paragrafo 2.2.3. Si è deciso di utilizzare la mediana e la MAD poiché sono indici statistici meno sensibili alla presenza di *outliers*.

Verranno ora presentate alcune immagini utili a riassumere e a descrivere i risultati ottenuti tramite l'analisi glicemica. Prima di tutto, è importante riportare la composizione degli eventi rilevati per valutare l'incidenza di quelli eliminati per la presenza di gap temporali critici o perché sono iniziati o terminati al di fuori dell'acquisizione CGM (figura 41). In figura 42 è rappresentato il grafico a barre relativo al numero di eventi completi classificati per ciascuna tipologia. Si può notare che l'ipoglicemia moderata, nel complesso, è stata la tipologia di evento glicemico più osservata nei pazienti. Per indagare in maniera approfondita la distribuzione degli eventi glicemici nella popolazione analizzata è stato effettuato un test statistico non parametrico di Wilcoxon-Mann-Whitney tra le varie categorie con livello di significatività standard pari a 0.05. Come riportato in figura 43 si possono notare differenze statisticamente significative tra il numero di eventi di natura moderata e severa separatamente sia per l'ipoglicemia che per l'iperglicemia, con una preponderanza statisticamente significativa di eventi di natura moderata (ipoglicemia moderata vs severa: p-value < 0.001; iperglicemia moderata vs severa: p-value = 0.003). Viceversa, non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra il numero di eventi di ipoglicemia ed iperglicemia per entrambi i gradi di severità (ipoglicemia vs iperglicemia moderata: p-value = 0.57; ipoglicemia vs iperglicemia severa: p-value = 0.08).

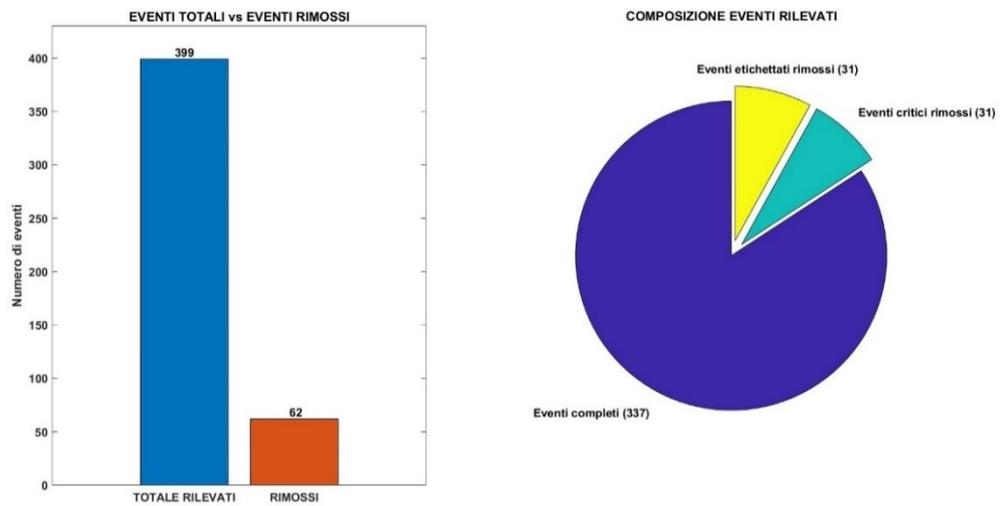


Fig. 41. A sinistra numero totale di eventi rilevati in tutti i pazienti vs rimossi. A destra è riportata la composizione degli eventi rilevati. In giallo sono rappresentati gli eventi rimossi poiché non è stato possibile identificare il punto di inizio o di fine all'interno dell'acquisizione CGM mentre in verde sono indicati gli eventi rimossi per la presenza di almeno un gap critico.

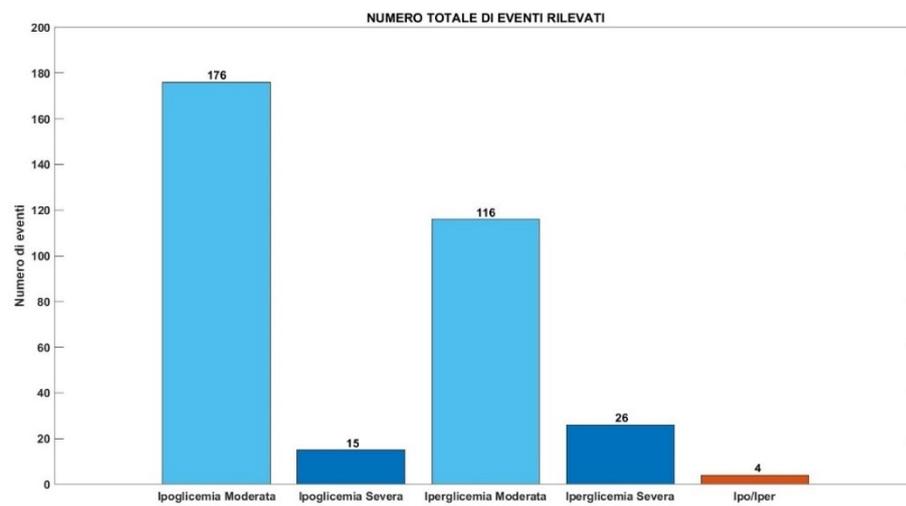


Fig. 42. Grafico a barre relativo al numero di eventi classificati per tipologia rilevati nella popolazione analizzata.

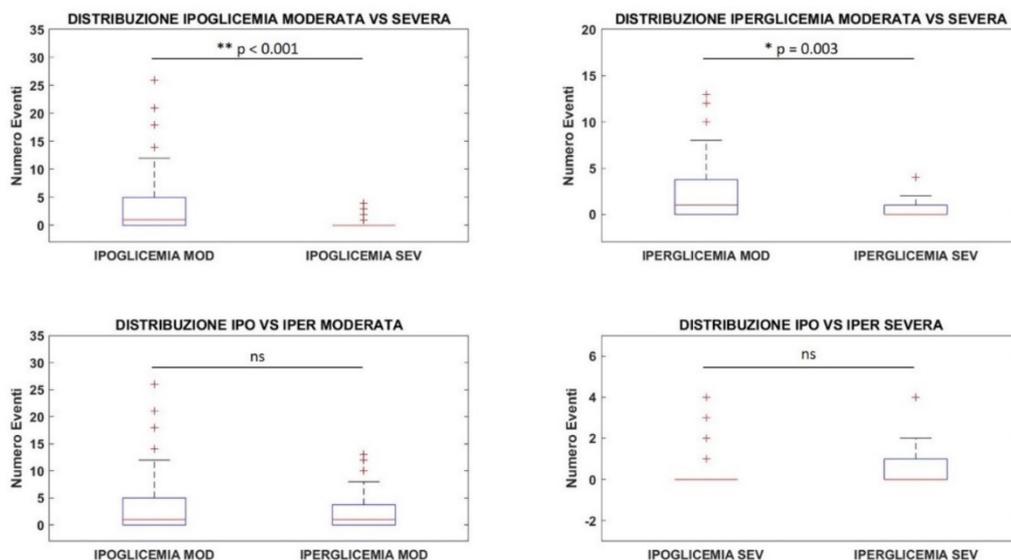


Fig. 43. Boxplot relativi alla distribuzione degli eventi in confronto tra ciascuna categoria. Soglia di significatività per il test statistico di Wilcoxon-Mann-Whitney pari a 0.05.

Per quanto riguarda la durata delle fluttuazioni glicemiche, in figura 44 è riportato il grafico a barre che riassume il tempo trascorso al di fuori del range di euglicemia nella popolazione analizzata per ciascuna tipologia di evento glicemico. Per valutare se vi sono differenze statistiche, anche in questo caso, è stato utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon-Mann-Whitney. In particolare, non sono state rilevate differenze significative tra il tempo trascorso in ipoglicemia rispetto al corrispettivo in iperglicemia, mentre la durata degli intervalli di euglicemia è statisticamente maggiore rispetto agli eventi glicemici (tempo ipoglicemia vs iperglicemia: p-value = 0.72; durata eventi glicemici vs euglicemia: p-value < 0.001; livello di significatività $\alpha = 0.05$) (fig. 45).

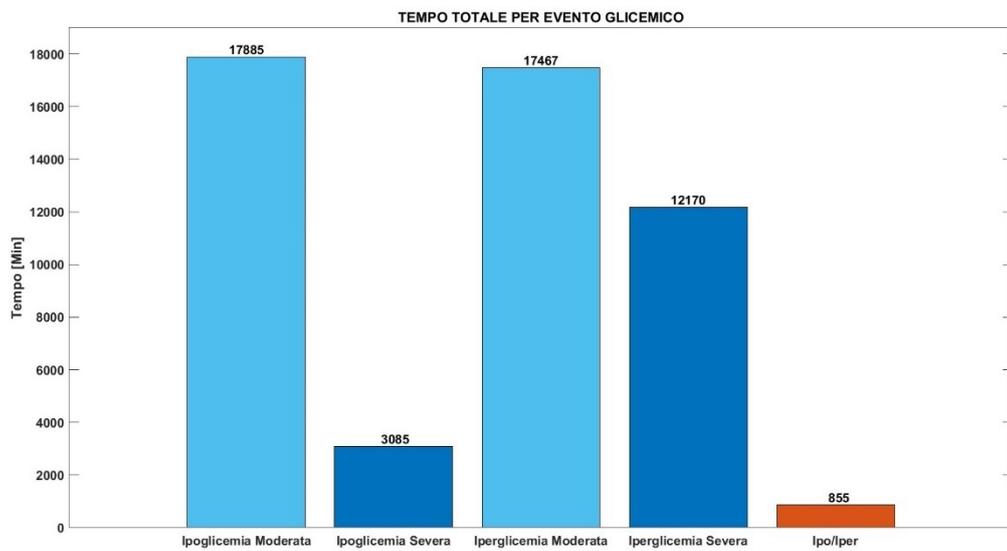


Fig. 44. Grafico a barre relativo al tempo totale in minuti trascorso per ciascuna tipologia di evento glicemico.

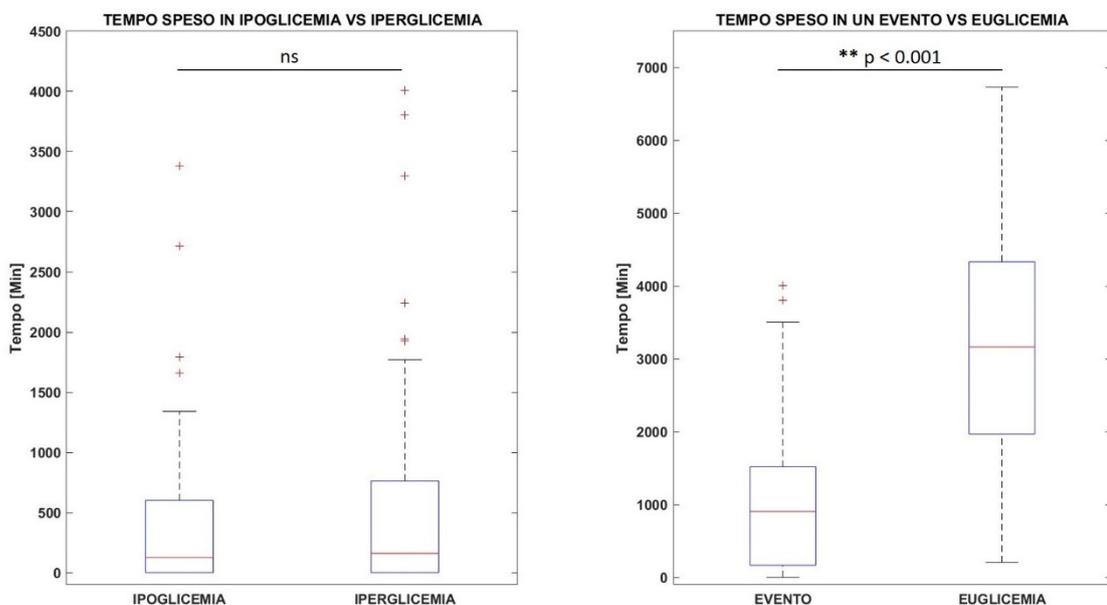


Fig. 45. A sinistra boxplot relativo al tempo speso in ipoglicemia verso quello speso in iperglicemia. A destra il boxplot che mette a confronto il tempo speso in un evento glicemico con quello speso all'interno del range di euglicemia.

3.1.2 Selezione del campione rappresentativo

Verranno ora descritti i risultati relativi alla fase di selezione del campione rappresentativo seguendo i criteri elencati nel paragrafo 2.3. In figura 46 è riportato il numero di pazienti che hanno superato ciascuna fase di selezione. È utile ricordare che al termine dell'analisi è stato rivalutato il paziente numero 5 poiché caratterizzato da un solo gap temporale critico nell'ultimo evento glicemico rilevato. Di conseguenza, dato che la finestra di acquisizione senza questa parte ha una dimensione ragionevole si è deciso di reintegrarlo prendendo in considerazione solamente il tracciato CGM senza il buco temporale critico. Nella tabella 5 sono riportati i parametri di selezione dei pazienti che soddisfano tutti i criteri necessari per proseguire l'analisi. Sono presenti anche alcune metriche riguardanti la durata della prima ed ultima finestra di euglicemia e sul tempo totale speso all'interno ed all'esterno del range di euglicemia. Queste consentono di ottenere delle informazioni preliminari sulla bontà del paziente prima di procedere con l'analisi NIRS.

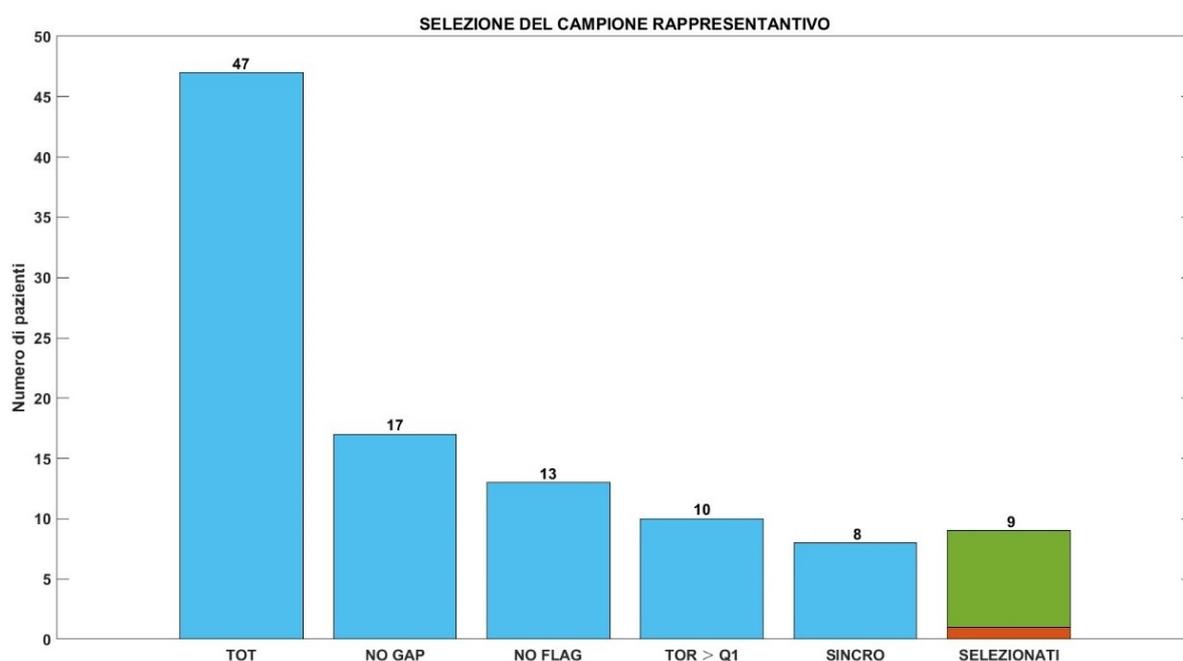


Fig. 46. Numero di pazienti che hanno superato i vari passaggi del processo di selezione del campione rappresentativo. *TOT* = numero di pazienti iniziali, *NO GAP* = numero di pazienti che non presentano gap temporali critici, *NO FLAG* = numero di pazienti il cui tracciato CGM inizia in condizione di euglicemia, *TOR% \geq Q1* = numero di pazienti il cui tempo totale percentuale speso al di fuori del range di euglicemia è maggiore del primo quantile di tale parametro calcolato sull'intero dataset (soglia = 9.75%), *SINCRO* = numero di pazienti in cui è possibile sincronizzare il tracciato CGM e l'acquisizione NIRS, *SELEZIONATI* = numero di pazienti che hanno superato la fase di selezione più il paziente numero 5 aggiunto a posteriori.

# PD	TIR FIRST [min]	TIR END [min]	DUR [min]	TIR [min]	TIR%	TOR [min]	TOR%
4	1060	565	5485	4360	79,49	1125	20,51
5	10	655	4750	3525	74,21	1225	25,79
8	185	225	5470	4385	80,16	1085	19,84
9	125	35	5355	3405	63,59	1950	36,41
11	205	480	1185	1065	89,87	120	10,13
14	40	195	4524	1020	22,55	3504	77,45
15	885	10	4165	3115	74,79	1050	25,21
19	1660	110	4280	3185	74,42	1095	25,58
47	2216	405	6746	6096	90,36	650	9,64

Tab. 5. Tabella riassuntiva con i parametri utilizzati per la fase di selezione dei pazienti. TIR FIRST = durata prima finestra di euglicemia, TIR END = durata ultima finestra di euglicemia, DUR = durata acquisizione CGM tra prima ed ultima euglicemia, TIR = tempo totale in euglicemia (e percentuale), TOR = tempo totale in evento glicemico (e percentuale).

3.1.3 Calcolo delle metriche glicemiche

Nella tabella 6, 7 e 8 sono riportati i valori calcolati per ogni metrica glicemica definita nel paragrafo 2.2.4. Questi parametri saranno successivamente messi in relazione con le alterazioni del pattern di attivazione cerebrale rilevato dalla matrice di connettività funzionale a riposo.

METRICHE BASATE SULLA STATISTICA DESCRITTIVA										
# PD	MEAN [mg/dL]	SD [mg/dL]	MEDIAN [mg/dL]	MAD [mg/dL]	Q1 [mg/dL]	Q3 [mg/dL]	IQR [mg/dL]	MIN [mg/dL]	MAX [mg/dL]	AUC_n
4	111,93	26,08	109	14	98	126	28	40	234	22,39
5	106,15	26,50	101	18	87	124	37	48	184	21,23
8	95,05	18,06	94	11	83	106	23	46	145	19,01
9	128,88	23,76	128	15	115	144	29	59	208	25,78
11	111,13	18,50	111	14	98	125	27	56	151	22,23
14	166,85	48,14	165	38	129	205	76	70	283	33,39
15	91,53	20,79	91	13	78	104	26	40	143	18,30
19	122,33	24,31	128	12	111	137	26	40	172	24,46
47	104,81	18,22	105	12	92	117	25	58	164	20,96

Tab. 6. Metriche glicemiche basate sulla statistica descrittiva.

METRICHE BASATE SULLA DURATA E NATURA DEGLI EVENTI GLICEMICI						
# PD	TOR%	TIR%	TAR%	TBR%	HYPO_n	HYPER_n
4	20,51	79,49	12,40	8,11	0,40	0,60
5	25,79	74,21	12,32	13,47	0,64	0,36
8	19,84	80,16	0,00	19,84	1,00	0,00
9	36,41	63,59	33,05	3,36	0,18	0,82
11	10,13	89,87	5,06	5,06	0,50	0,50
14	77,45	22,55	72,92	0,00	0,00	0,80
15	25,21	74,79	0,00	25,21	1,00	0,00
19	25,58	74,42	17,87	7,71	0,17	0,83
47	9,64	90,36	3,93	5,71	0,63	0,38

Tab. 7. Metriche glicemiche basate sulla durata e natura degli eventi glicemici. Tali parametri sono adimensionali.

METRICHE BASATE SULLA VARIABILITÀ GLICEMICA							
# PD	CV	AARC	SDRC	MODD	CONGA1	CONGA2	CONGA4
4	0,23	0,72	1,09	22,67	22,10	29,61	32,46
5	0,25	0,77	1,06	43,99	21,11	26,60	31,42
8	0,19	0,59	0,78	19,13	22,94	25,80	24,39
9	0,18	0,57	0,84	34,09	18,38	24,28	25,40
11	0,17	0,54	0,80	0,00	16,84	22,46	23,51
14	0,29	0,89	1,47	93,76	26,20	33,77	41,63
15	0,23	0,76	1,04	20,54	23,25	24,87	25,91
19	0,20	0,69	0,96	17,54	17,91	24,64	30,30
47	0,17	0,49	0,68	20,03	17,83	20,25	20,76

Tab. 8. Metriche basate sulla variabilità glicemica. Tali parametri sono adimensionali.

3.2 RISULTATI DELL'ANALISI NIRS

In questo paragrafo verranno riportati i risultati più significativi ottenuti al termine dell'analisi NIRS con conseguente calcolo delle matrici di connettività funzionale cerebrale a riposo. I segnali acquisiti relativi all'emodinamica cerebrale sono stati preprocessati in modo tale da ottenere per ogni paziente un tracciato il più possibile privo di rumore e con eventuali artefatti da movimento attenuati o rimossi. I principali risultati dei vari passaggi del *preprocessing* sono stati descritti nel paragrafo 2.4.3, nel quale sono anche indicati i vantaggi e le limitazioni delle strategie adottate.

Il segnale NIRS pulito è stato quindi utilizzato per ricostruire le immagini DOT e si è ottenuto il segnale concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata, per ciascun nodo della mesh utilizzata, nella finestra migliore identificata nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia. A questo punto è stata effettuata la *resting state functional connectivity* e si sono ottenute le matrici di connettività. Ciascun paziente è caratterizzato da 4 matrici rsFC, le quali indicano il grado di correlazione tra le ROI del segnale concentrazione HbO ed HbR nelle due finestre temporali identificate. Per non appesantire troppo la trattazione, di seguito verranno riportate solamente le matrici rsFC degne di nota mentre i risultati completi sono presenti in Appendice.

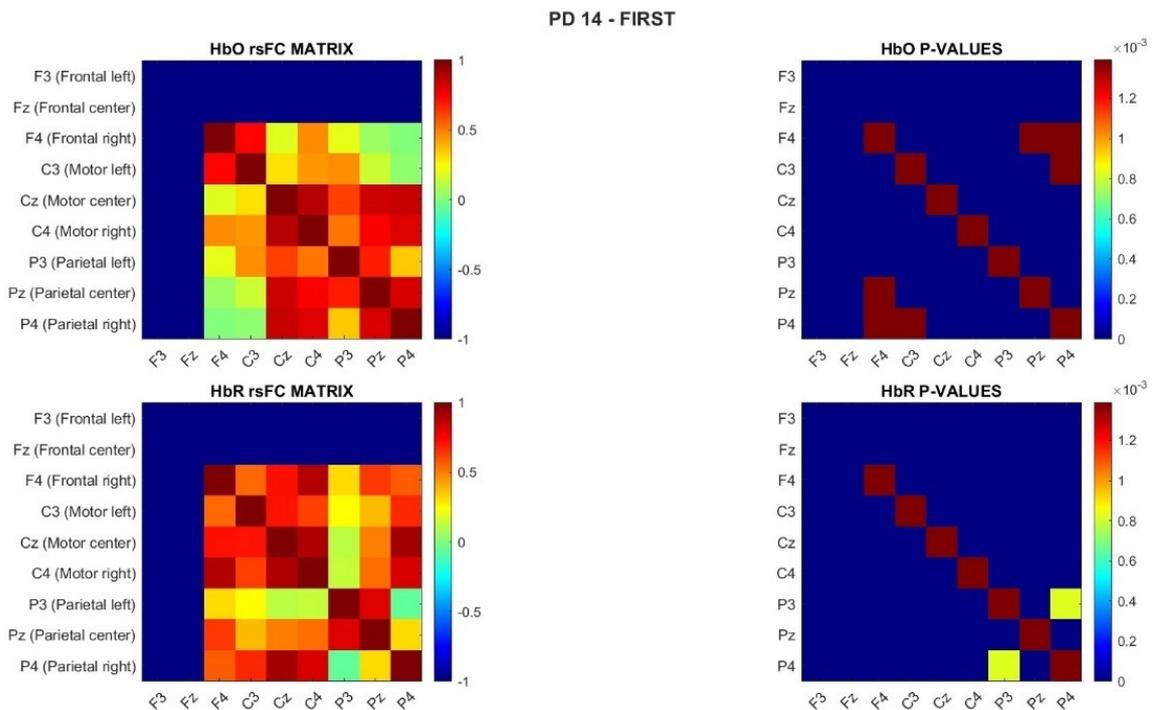


Fig. 47. Matrici rsFC riferite al paziente 14 nella finestra migliore identificata nel primo intervallo di euglicemia. In questo paziente due ROI sono state escluse poiché non sufficientemente sensibili all'array di good channels utilizzato. Nella matrice dei p-value i riquadri in rosso si riferiscono a correlazioni non statisticamente significative. Livello di significatività con correzione di Bonferroni per 36 confronti effettuati: $\alpha_{\text{bonf}} = 0.0014$.

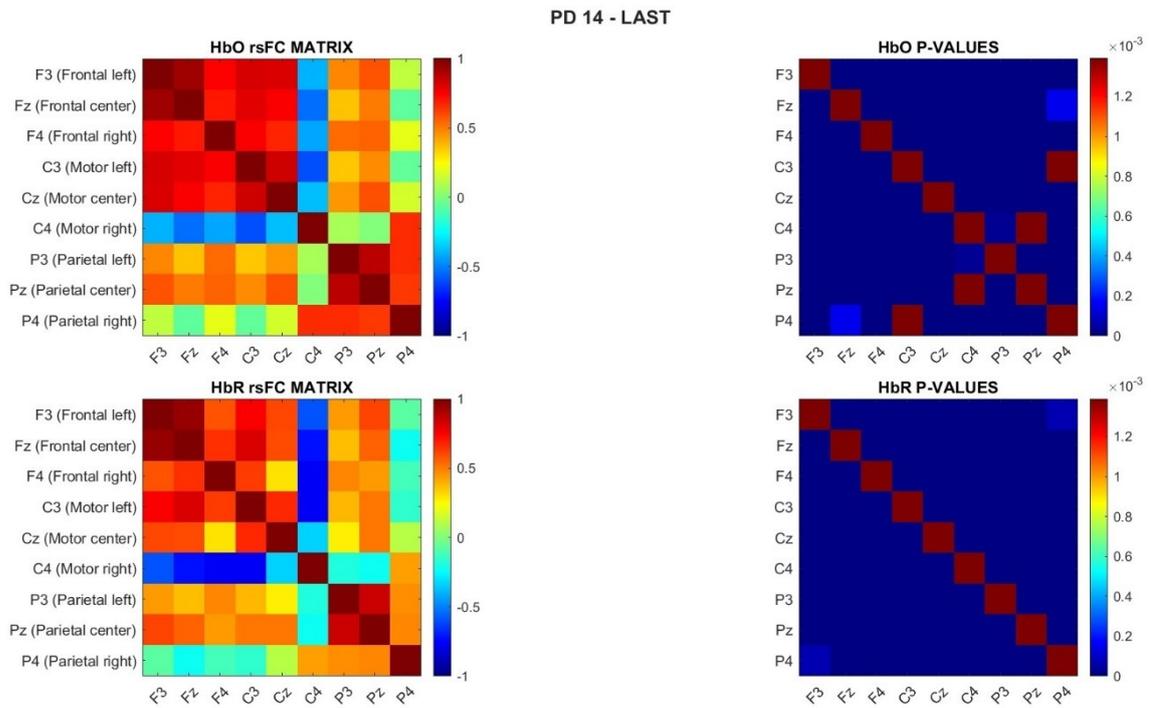


Fig. 48. Matrici rsFC riferite al paziente 14 nella finestra migliore identificata nell'ultimo intervallo di euglicemia. In questo caso non sono state rimosse ROI poiché sono tutte sufficientemente sensibili all'array di good channels utilizzato. Nella matrice dei p-value i riquadri in rosso si riferiscono a correlazioni non statisticamente significative. Livello di significatività con correzione di Bonferroni per 36 confronti effettuati: $\alpha_{\text{bonf}} = 0.0014$.

Come affermato nel paragrafo 2.5.1 il paziente numero 14 è l'unico nel quale alcune ROI sono state escluse dall'analisi rsFC in quanto non coperte a sufficienza dall'array di canali utilizzato nella finestra migliore identificata nel primo intervallo di euglicemia. In particolare, sono state rimosse 2 ROI frontali (Fz e F3) poiché il loro numero di nodi sensibili è risultato minore della soglia impostata (1/3 del numero totale di nodi per singola ROI). Fz contiene 161 nodi di cui solo 5 attivi (soglia: 54) mentre F3 è caratterizzata da 262 di cui 82 attivi (soglia: 87). In figura 47 sono rappresentate le matrici rsFC, calcolate in riferimento alla finestra migliore identificata nel primo intervallo di euglicemia, nelle quali si può notare che i valori relativi a Fz e F3 sono stati correttamente rimossi. Per completezza espositiva sono state riportate anche le matrici ottenute, per lo stesso paziente, tramite l'analisi dell'ultimo intervallo di euglicemia. Come si può notare nella figura 48, in questo caso nessuna ROI è stata esclusa poiché sono tutte sufficientemente sensibili all'array di *good channels* identificato per la finestra migliore.

È utile ora effettuare un'analisi qualitativa dei pattern di attivazione ricorrenti rilevati nelle matrici di rsFC riportate in Appendice. Si può notare che 5 pazienti sono caratterizzati interamente da forti correlazioni positive. In particolare: PD4 ultima finestra HbO e HbR, PD8 prima finestra HbO, PD11 ultima finestra HbO, PD14 entrambe le finestre per HbO ed HbR, PD19 ultima finestra HbO. Si nota quindi che solamente nel paziente 14 questa elevata correlazione positiva è presente in entrambi gli istanti temporali valutati e per ogni cromoforo;

mentre nel PD4 questa coerenza è presente solamente nell'ultima finestra di euglicemia. Tramite un'ispezione visiva si sono riscontrati 7 pazienti con pattern di attivazioni simili tra le matrici di connettività riferite ad HbO ed HbR. In particolare, 2 pazienti in relazione alla prima finestra di euglicemia (PD8 e PD11) e 5 all'ultima (PD4, PD5, PD14, PD15 e PD47). Viceversa, in 2 neonati si sono osservati comportamenti non coerenti tra le matrici di rsFC. PD9 ha un numero elevato di coppie di ROI che cambiano segno di correlazione tra HbO (correlazione positiva) ed HbR (correlazione negativa); questa differenza è rilevata per entrambe le finestre di euglicemia. Analogamente anche PD19 è caratterizzato dallo stesso comportamento. Di particolare interesse sono alcuni risultati ottenuti in 3 pazienti (PD11, PD14 e PD47) nei quali si sono rilevate intere ROI con un valore di correlazione negativo sia per HbO che per HbR, in disaccordo con la restante matrice. Questo comportamento è stato rilevato nella prima finestra di euglicemia per il paziente 11 (ROI P4) e 47 (ROI Fz) mentre nell'ultima finestra di euglicemia per il paziente 14 (ROI C4 e P4). Sebbene questo comportamento sia rilevato in poche matrici rsFC e possa sembrare causato da un eventuale rumore residuo nel segnale, è utile ricordare che è stato applicato un meticoloso e stringente *preprocessing*. Risulta quindi poco probabile che questa relazione sia dovuta da una componente spuria. Nonostante ciò, ulteriori analisi sono necessarie per indagare in maniera approfondita la causa di questo fenomeno osservato.

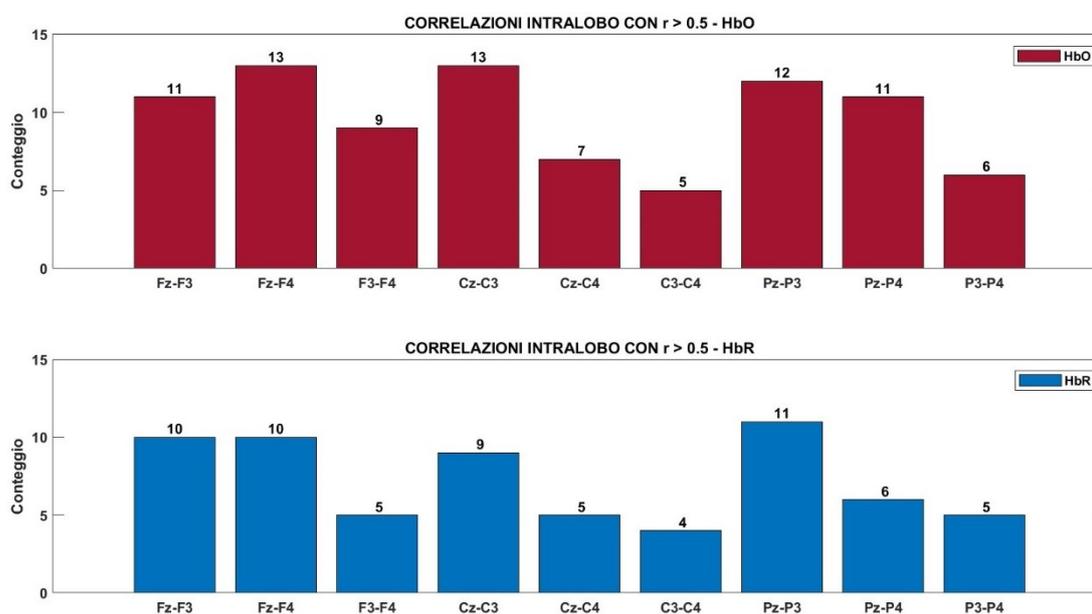


Fig. 49. Grafico a barra contenente il numero di coppie di ROI appartenenti allo stesso lobo con correlazione positiva e maggiore di 0.5.

A seguito di una ispezione visiva dei risultati ottenuti si è notato che in alcune matrici di rsFC vi sono dei pattern di attivazione ricorrenti soprattutto tra coppie di ROI appartenenti allo stesso lobo cerebrale. Poiché nella maggior parte dei casi la correlazione sembra essere fortemente

positiva, per indagare questo aspetto è stato valutato il numero di coppie di ROI all'interno dello stesso lobo (frontale, parietale o motorio) che hanno un coefficiente di correlazione positivo e maggiore di 0.5. In figura 49 è riportato il grafico a barre ottenuto al termine di questa analisi.

Prima di procedere alla correlazione tra variazioni dell'emodinamica cerebrale e variabilità glicemiche è interessante effettuare un primo controllo visivo per valutare se la connettività cerebrale è stata alterata tra la prima e l'ultima finestra di euglicemia rilevata. A tal proposito, dopo aver applicato lo z-score, è stata calcolata la differenza assoluta tra le rsFC dei due intervalli in analisi. Successivamente per ogni paziente si è calcolato il numero di coppie di ROI che hanno subito variazioni assolute maggiori del 25% e 50%. Le ROI con un cambiamento maggiore del 50% hanno subito una variazione del segno di correlazione. In figura 50 è riportato il grafico a barre contenente il numero di ROI che hanno subito delle alterazioni per ogni paziente e per ogni cromoforo.

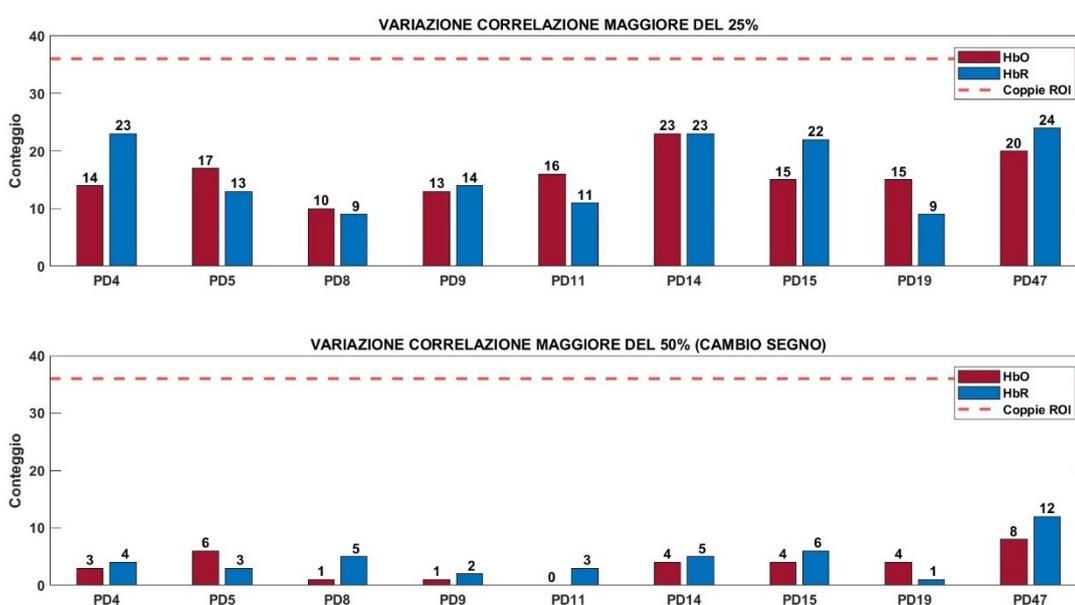


Fig. 50. Grafico a barre relativo al numero di coppie di ROI per ogni paziente che hanno subito una variazione di correlazione maggiore del 25% e 50%. La linea rossa tratteggiata indica il numero complessivo di coppie di correlazioni (36).

Si è poi effettuato un test per valutare se le differenze rilevate tra le matrici di connettività cerebrale a riposto nei due istanti temporali presi in considerazione sono statisticamente significative. Dopo aver caricato i dati relativi alle rsFC di tutti i pazienti e dopo aver effettuato un processo di z-score, data la normalità del dataset è stato applicato un t-test tra il segnale di ogni singola coppia di ROI rilevato nella finestra migliore all'interno del primo ed ultimo intervallo di euglicemia. È stata osservata una sola differenza significativa tra il segnale HbR appartenente alla coppia Fz – Pz (t-stat = -2.51, p-value = 0.025, significatività $\alpha = 0.05$).

3.3 RISULTATI DELLA CORRELAZIONE TRA EVENTI GLICEMICI E *RESTING STATE FUNCTIONAL CONNECTIVITY*

In questo paragrafo verranno riportati i risultati ottenuti dall'analisi di correlazione tra le metriche di variabilità glicemica calcolate in riferimento al segnale CGM e le alterazioni della connettività cerebrale a riposo misurate tramite NIRS. Per la rappresentazione dei risultati si è utilizzato il *toolbox* BrainNet Viewer (Versione 1.7, Beijing Normal University) [85] con la mesh corrispondente ad un neonato prematuro di 33 settimane, presente all'interno del database utilizzato nel paragrafo 2.4.4 per la ricostruzione delle immagini DOT.

Verranno ora riportati i risultati esplorativi, cioè quelli ottenuti applicando una semplice correlazione di Spearman tra le metriche glicemiche ed emodinamiche, senza correggere per confronti multipli. Poiché sono state effettuate numerose comparazioni, verranno rappresentate unicamente quelle statisticamente significative con un *p-value* inferiore al livello di significatività standard (0.05). Per quanto riguarda l'emoglobina ossigenata sono state rilevate 24 correlazioni statisticamente significative su 828 confronti totali (singola coppia di ROI – singola metrica glicemica), mentre per l'emoglobina deossigenata si sono verificate 39 correlazioni significative sempre su 828 confronti totali. Per facilitarne la lettura, ove possibile, i risultati verranno rappresentati utilizzando la stessa suddivisione delle metriche glicemiche utilizzata nel paragrafo 2.2.4. Nelle prossime figure è utilizzato il colore rosso per indicare una correlazione positiva e il colore blu per indicare una correlazione negativa.

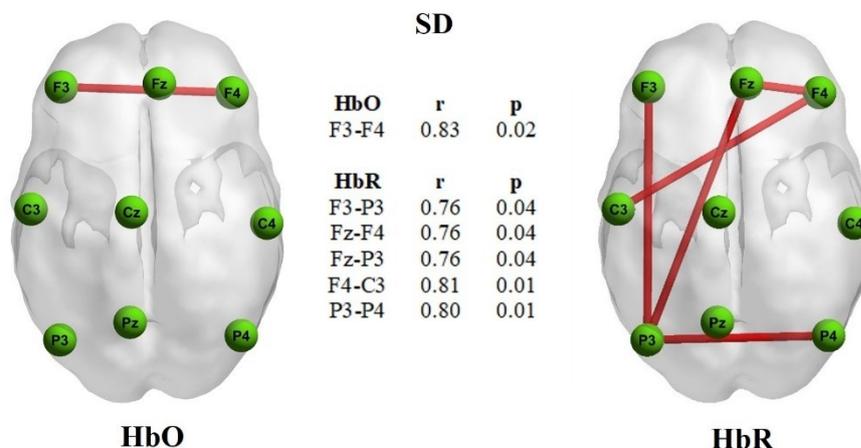


Fig. 51. Correlazione tra deviazione standard e differenze di rsFC per HbR e HbO (metriche glicemiche basate su statistica descrittiva).

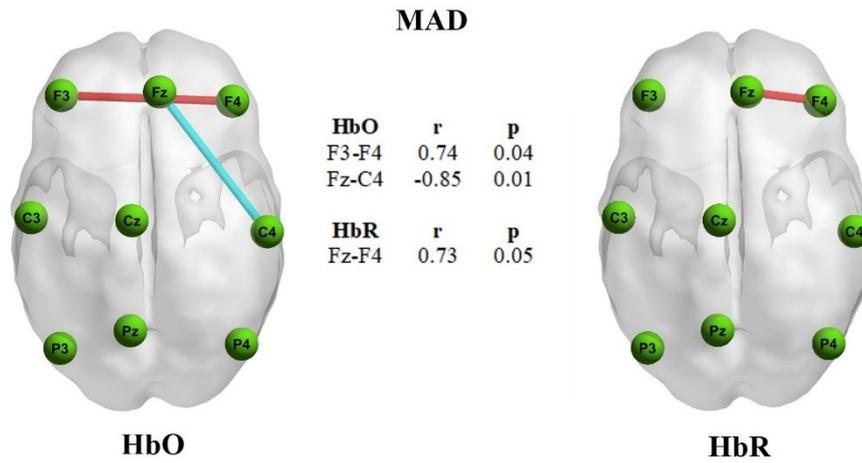


Fig. 52. Correlazione tra Median Absolute Difference e differenze di rsFC per HbR e HbO (metriche glicemiche basate su statistica descrittiva).

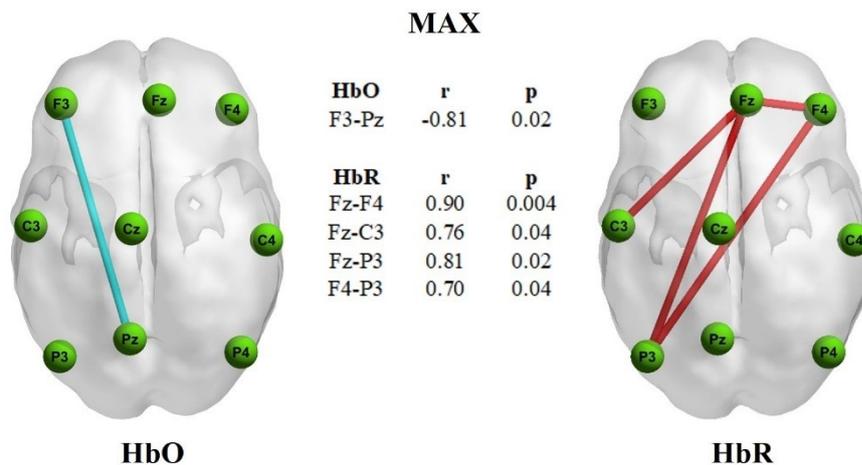
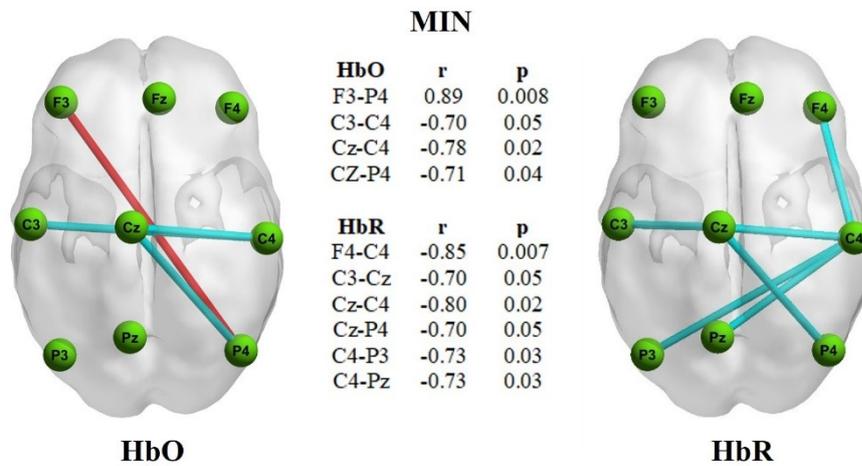


Fig. 53. Correlazione tra valore minimo (SOPRA) e massimo (SOTTO) assunto dal segnale glicemico e le differenze di rsFC per HbR e HbO (metriche glicemiche basate su statistica descrittiva).

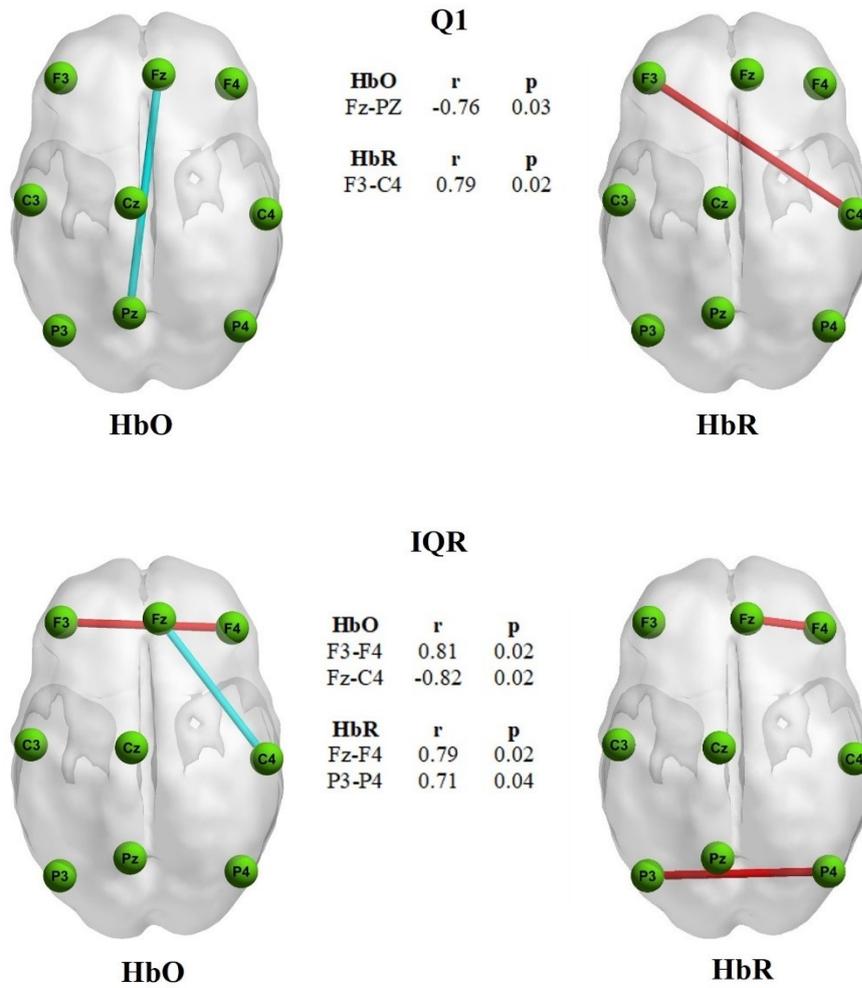


Fig. 54. Correlazione tra il primo quantile (SOPRA) e il range interquartile (SOTTO) calcolato rispetto al segnale glicemico e le differenze di rsFC per HbR e HbO (metriche glicemiche basate su statistica descrittiva).

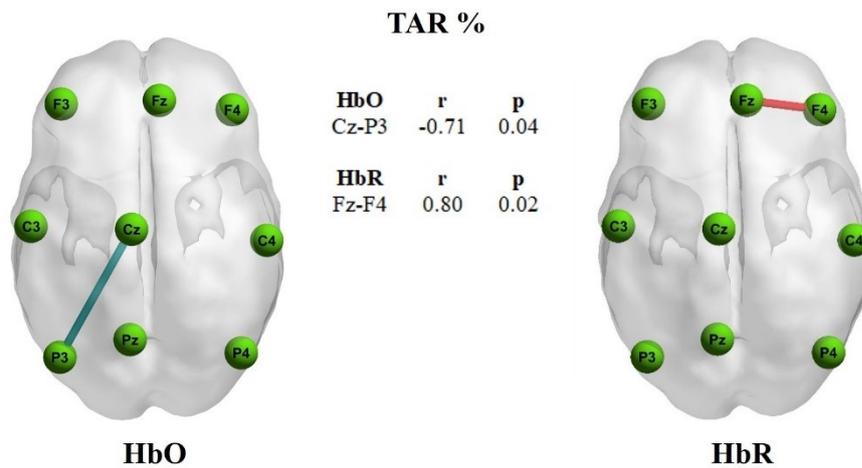


Fig. 55. Correlazione tra il tempo passato in un evento iperglicemico e le differenze di rsFC per HbR e HbO (metriche glicemiche basate sulla durata e natura degli eventi glicemici).

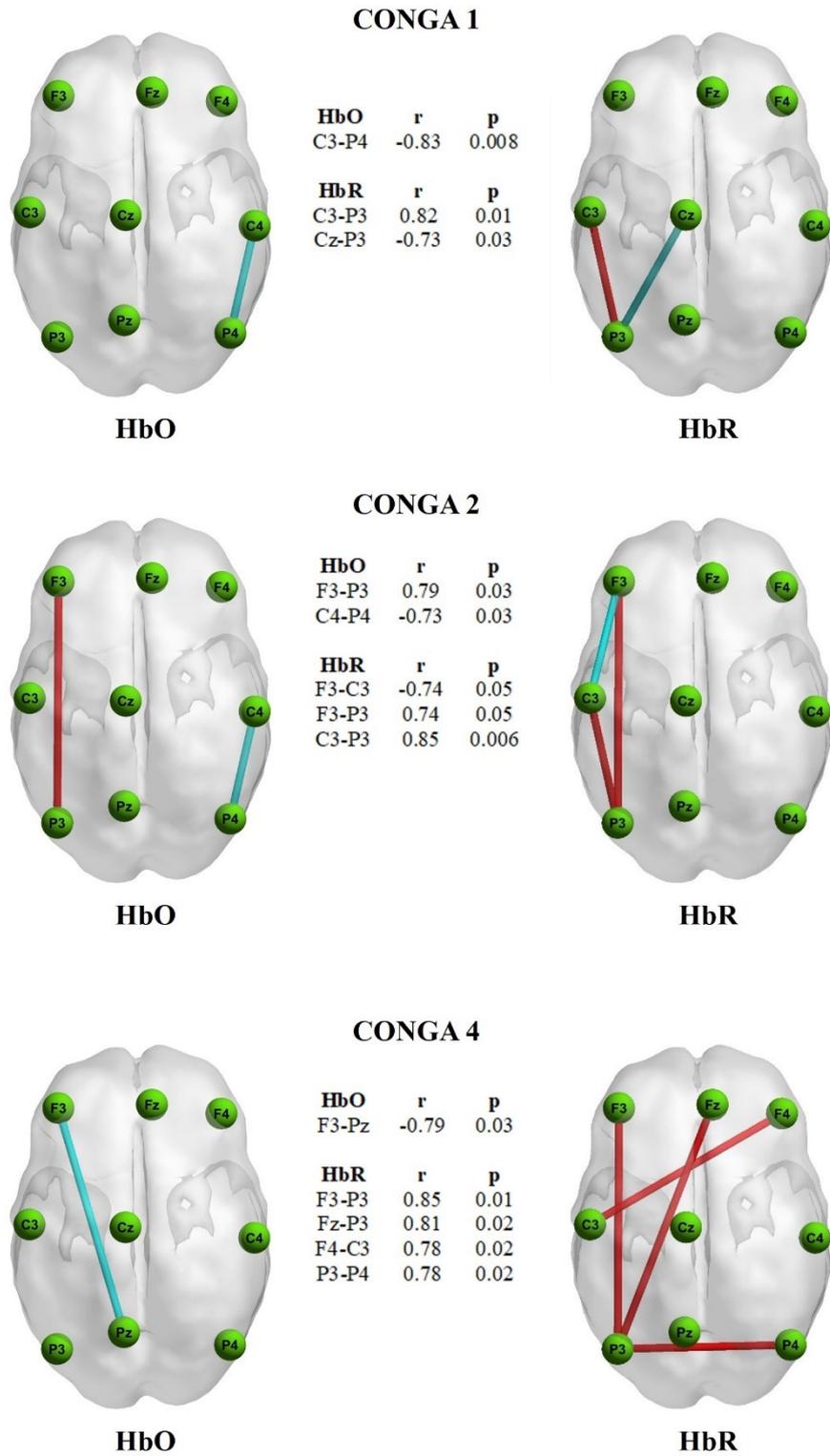


Fig. 56. Correlazione tra la variabilità glicemica intragiornaliera calcolata a diversi intervalli temporali (1,2,4 ore) e le differenze di rsFC per HbR e HbO (metriche glicemiche basate sulla variabilità glicemica).

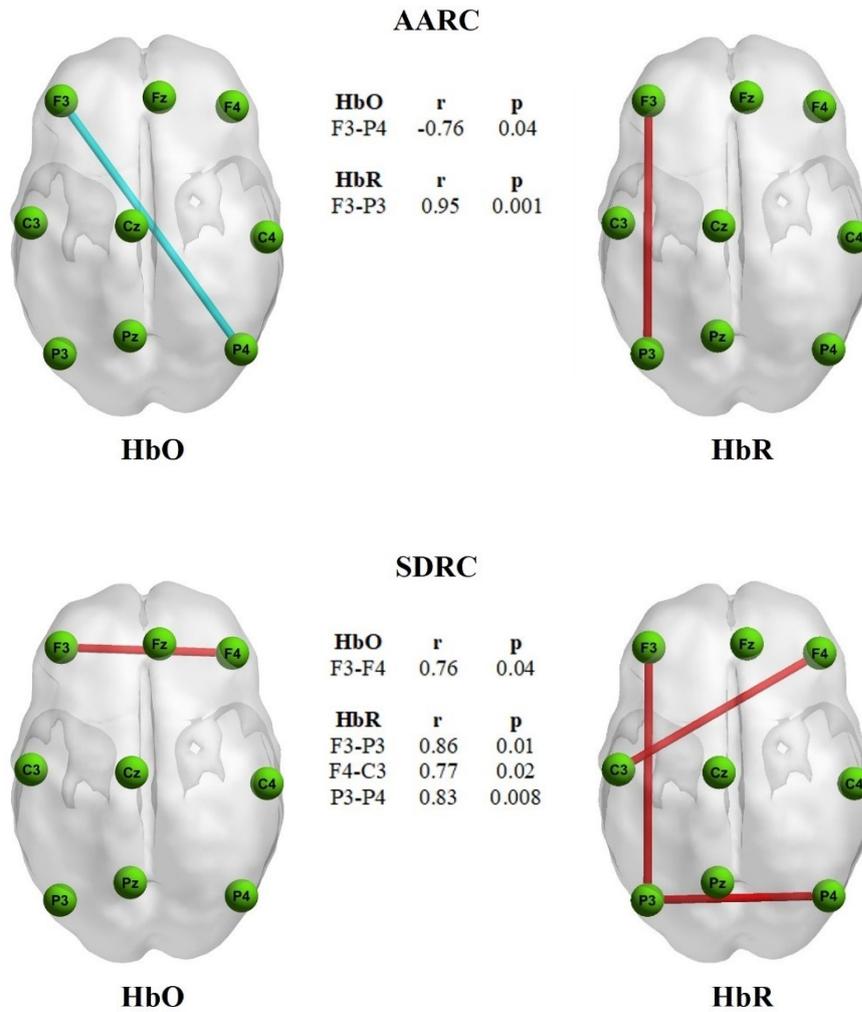


Fig. 57. Correlazione tra la Average Absolute Rate of Change (SOPRA) e Standard Deviation of Rate of Change (SOTTO) con le differenze di rsFC per HbR e HbO (metriche glicemiche basate sulla variabilità glicemica).

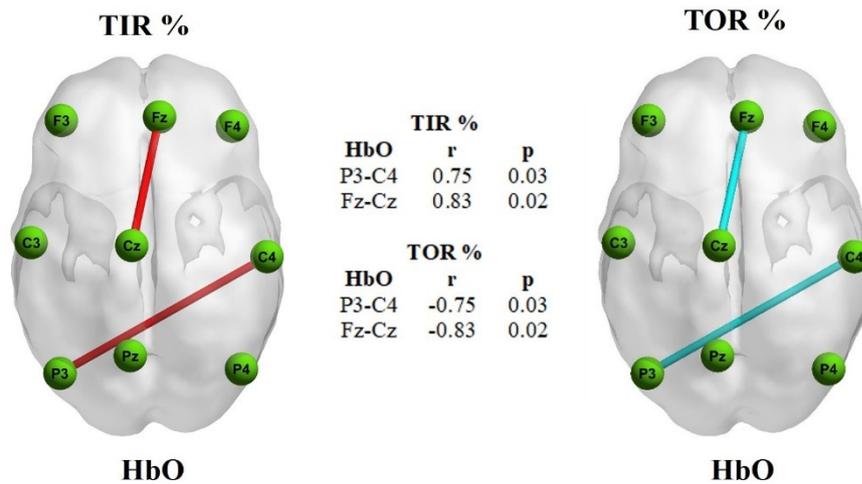


Fig. 58. Correlazione tra il tempo speso in euglicemia (SINISTRA) e il tempo speso in un evento glicemico (DESTRA) con la variazione di rsFC per HbO (metriche glicemiche basate sulla durata e natura degli eventi glicemici).

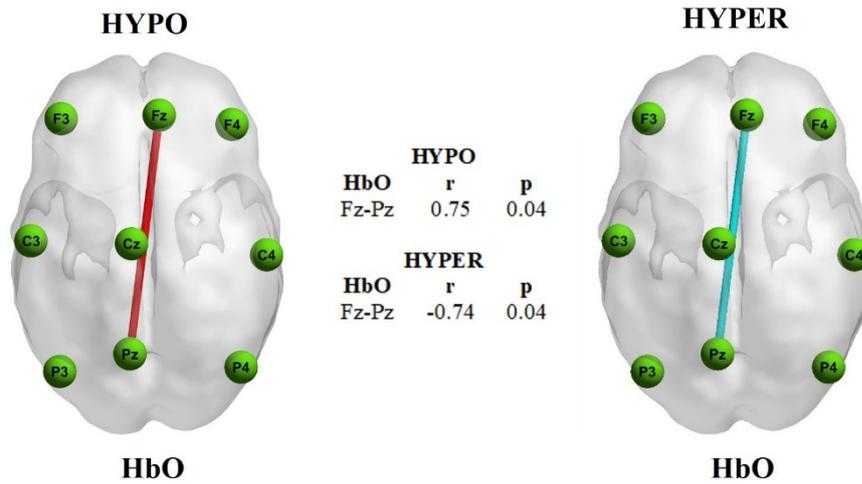


Fig. 59. Correlazione tra il numero di eventi ipoglicemici (*SINISTRA*) e il numero di eventi iperglicemici (*DESTRA*) con la variazione di rsFC per HbO (metriche glicemiche basate sulla durata e natura degli eventi glicemici).

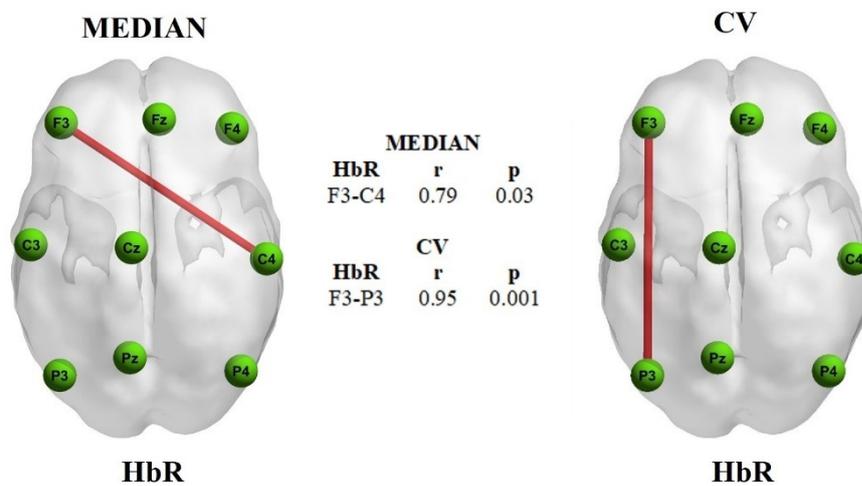


Fig. 60. Correlazione tra il valore mediano assunto dal segnale CGM (*SINISTRA*) e il coefficiente di variazione (*DESTRA*) con la variazione di rsFC per HbR (metriche glicemiche basate sulla statistica descrittiva e sulla variabilità glicemica).

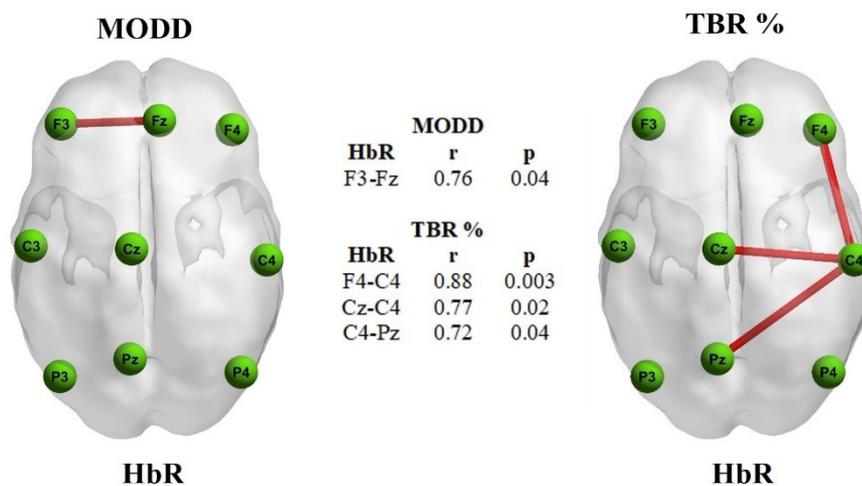


Fig. 61. Correlazione tra la variazione glicemica intergiornaliera (*SINISTRA*) e tempo speso in ipoglicemia (*DESTRA*) con la variazione di rsFC per HbR (metriche glicemiche basate sulla variabilità glicemica e sulla durata degli eventi glicemici).

Anche in questo caso è utile effettuare una breve ispezione visiva dei risultati. Le correlazioni che valutano la deviazione standard sono in prevalenza nel segnale HbR (5 positive) rispetto ad HbO (1 positiva) (fig. 51). Per quanto riguarda la *Median Absolute Difference* sono state osservate due correlazioni significative di segno opposto per coppie di ROI in HbO mentre una positiva per HbR (fig. 52). Per il segnale HbR si sono riscontrate un numero maggiore di correlazioni negative in relazione al valore minimo acquisito dal sensore CGM rispetto al valore massimo, nel quale le correlazioni hanno segno positivo (fig. 53). Le relazioni tra il valore del primo quantile del tracciato CGM rilevato e il relativo range interquartile non hanno evidenziato particolari pattern ricorrenti (fig. 54). Una correlazione negativa e una positiva sono state rilevate rispettivamente nella differenza di segnale HbO e HbR per il tempo totale percentuale speso in condizione iperglicemica (fig. 55). Più interessante è il comportamento in relazione alla variabilità glicemica intragiornaliera calcolata in intervalli temporali di diversa estensione. Si è rilevato un comportamento congruo per il segnale HbO mentre un incremento del numero di correlazioni è stato riscontrato per il segnale HbR all'aumentare dell'estensione della finestra temporale nella quale è stata calcolata la metrica glicemica CONGA (fig. 56). La differenza di rsFC calcolata per la coppia F3-P3 riferita al segnale HbR è correlata positivamente sia per l'*Absolute Average Rate of Change* sia per il suo indice di dispersione SDRC (fig. 57). Per quanto riguarda la percentuale di tempo trascorso in un evento glicemico e in un intervallo di euglicemia si sono ottenuti risultati complementari per il segnale HbO, l'unico che presenta correlazioni significative per queste due metriche glicemiche (fig. 58). Lo stesso comportamento è stato riscontrato per il numero di eventi di ipoglicemia ed iperglicemia normalizzati (fig. 59). Avendo a disposizione solamente correlazioni significative per HbR, nessuna osservazione può essere effettuata per le metriche glicemiche relative alla mediana e al coefficiente di variazione del segnale CGM (fig. 60) e tra la variabilità intergiornaliera e il tempo percentuale trascorso in un evento ipoglicemico (fig. 61). Tuttavia, è importante sottolineare la forte correlazione positiva riscontrata tra CV e la differenza di connettività in HbR nella coppia di ROI F3-P3 ($r = 0.95$, $p\text{-value} = 0.001$) (fig. 60 destra). Un comportamento identico è stato riscontrato in relazione alla metrica glicemica AARC (fig. 57).

Per valutare l'effettiva significatività statistica di queste correlazioni sono stati applicati i seguenti metodi di correzione per confronti multipli: Bonferroni, Bonferroni-Holm e FDR (Benjamini & Yekutieli). Il livello di significatività corretto di Bonferroni è 0.002 ed è stato calcolato come il rapporto tra il valore critico standard (0.05) e il numero di confronti effettuati per ogni coppia di ROI (nel caso in analisi 23). Bonferroni-Holm e FDR restituiscono i *p-value* corretti, i quali devono poi essere confrontati con il livello di significatività standard ($\alpha_{\text{sig}}=0.05$).

Come affermato nel paragrafo 2.6, i risultati ottenuti tramite questi metodi di correzione sono uguali e coerenti. In particolare, si sono riscontrate solamente due correlazioni positive statisticamente significative nell'emoglobina deossigenata tra la coppia di ROI F3-P3 e le metriche glicemiche CV e AARC (fig. 62). Dunque, elevati valori di AARC e CV corrispondono ad una ampia variazione positiva di rsFC tra F3-P3, calcolata come differenza tra l'ultima e la prima finestra di euglicemia per il segnale HbR (fig. 63). In altre parole, nella popolazione analizzata, i pazienti che hanno dimostrato una maggiore variabilità glicemica hanno sperimentato un aumento della connettività cerebrale tra la zona frontale e parietale sinistra (network fronto-parietale sinistro).

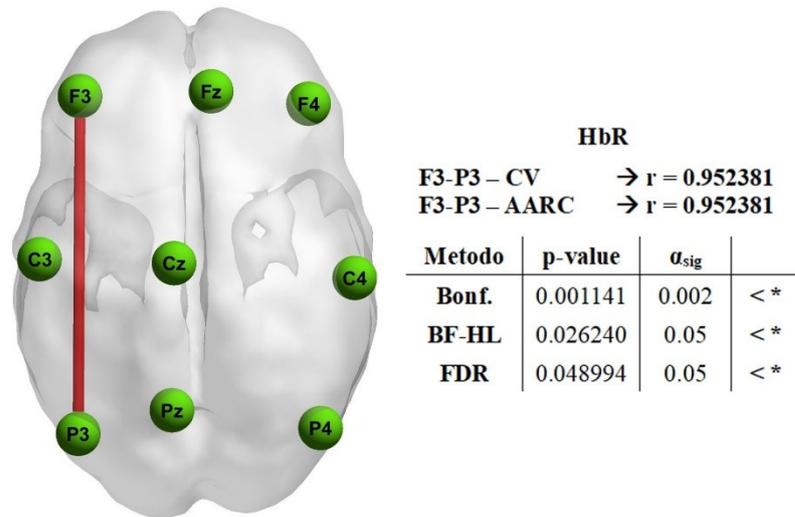


Fig. 62. Correlazione tra il Coefficiente di Variazione e l'Absolute Average Rate of Change con la variazione di rsFC per HbR (metriche basate sulla variabilità glicemica). Nella tabella sono riportati i p-value e i livelli di significatività (α_{sig}) utilizzati per il metodo di correzione di Bonferroni (Bonf.), Bonferroni-Holm (BF-HL) e FDR.

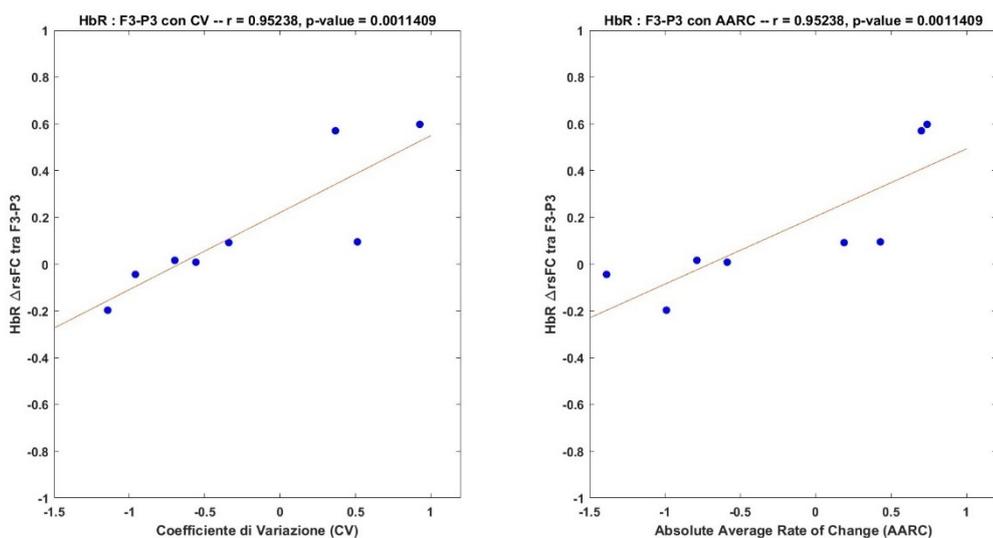


Fig. 63. Scatter plot tra il coefficiente di variazione (SINISTRA) e l'Absolute Rate of Change (DESTRA) con la variazione di rsFC in F3-P3 per HbR.

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi è stata effettuata l'analisi dei tracciati CGM per poter estrarre alcune metriche che riassumono la variabilità glicemica con lo scopo di indagare se vi è una relazione con l'alterazione dell'emodinamica cerebrale. Tuttavia, è utile riportare alcune considerazioni sui risultati ottenuti tramite l'analisi glicemica effettuata in riferimento a tutti i pazienti arruolati nello studio "*BabyGlucoLight*". Il database a disposizione contiene i segnali CGM di 47 neonati prematuri con una durata di acquisizione minima di 20 ore fino ad un massimo di 6 giorni. Tuttavia, uno dei problemi riscontrati nell'utilizzo di questo dataset è la mancanza di una nomenclatura omogenea e di un approccio comune nell'archiviazione dei dati. L'algoritmo sviluppato per effettuare l'analisi glicemica consente di caricare in maniera automatica il dataset, fornendone una versione standardizzata da poter consultare ed utilizzare agilmente in eventuali analisi future. Avere a disposizione una così ampia gamma di dati neonatali consente di indagare la frequenza degli eventi glicemici rilevati dal sensore ed effettuare alcuni paragoni con le informazioni presenti in letteratura. L'analisi glicemica dei tracciati CGM dell'intera popolazione ha rilevato un totale di 337 eventi correttamente acquisiti. La loro composizione è la seguente: 176 ipoglicemie moderate (52.23%), 15 ipoglicemie severe (4.45%), 116 iperglicemie moderate (34.42%) e 26 iperglicemie severe (7.72%). Inoltre, l'algoritmo ha classificato 4 eventi (1.18%) come "Ipo/Iper"; in questi eventi il segnale ha fluttuazioni di entrambe le tipologie. In totale, dunque, sono stati rilevati 191 eventi ipoglicemici (56.78%) e 142 eventi iperglicemici (42,14%). Nonostante vi sia un numero limitato di studi sulla variabilità glicemica in neonati prematuri, il risultato ottenuto dalla mia analisi è coerente con quanto riportato finora in letteratura. Infatti, uno studio condotto da Sharma et al. [14] ha rilevato una frequenza di eventi ipoglicemici compresa tra il 45% e il 50% in neonati prematuri con un peso alla nascita inferiore ai 1500 g, popolazione per caratteristiche simile a quella a mia disposizione. Sebbene sia stato rilevato un numero maggiore di ipoglicemie moderate, l'analisi della loro distribuzione nella popolazione non ha riscontrato differenze statisticamente significative rispetto alla frequenza di iperglicemie di pari severità. Le stesse conclusioni si

possono trarre per quanto riguarda l'analisi tra le distribuzioni di eventi ipoglicemici ed iperglicemici severi. Viceversa, la differenza tra le frequenze di ipoglicemie ed iperglicemie di diversa gravità, sono rispettivamente statisticamente significative. I risultati ottenuti sono in disaccordo con quanto affermato nel capitolo iniziale relativo all'analisi della letteratura. Infatti, è ben noto che nelle prime ore successive al parto i neonati prematuri sperimentano più frequentemente eventi di natura ipoglicemica [14]. Questa discordanza nei risultati può essere spiegata dal protocollo di acquisizione CGM impiegato nello studio. Infatti, da un lato, non sempre il personale medico incaricato di posizionare il sensore è presente al momento della nascita e altre procedure cliniche (compreso l'ottenere il consenso allo studio da parte del genitore) possono essere necessarie prima di inserire il sensore CGM. L'inizio della rilevazione glicemica, dunque, può avvenire ad istanti temporali diversi nei vari pazienti (l'arruolamento da protocollo è previsto entro le 48 ore dalla nascita) che possono essere distanti anche ore/giorni dal momento del parto, non riuscendo di conseguenza a rilevare le fluttuazioni glicemiche sperimentate in questo intervallo di tempo. Dall'altro lato, la possibilità fornita dal CGM di conoscere le glicemie in tempo reale consente al personale medico di intervenire prontamente in caso di ipoglicemie moderate. Considerando che l'iperglicemia può essere dovuta ad una somministrazione troppo veloce di glucosio in risposta all'ipoglicemia, il sensore CGM potrebbe comportare un aumento (rispetto alla terapia standard) di iperglicemie, come risposta ai trattamenti ipoglicemici. Inoltre, si deve tenere conto del numero cospicuo di eventi rimossi dovuti dalla presenza di gap temporali critici.

Dall'analisi glicemica sono state effettuate anche delle valutazioni sulla durata degli eventi rilevati. È emerso che la popolazione ha sperimentato per più tempo ipoglicemie moderate, seguite a breve distanza dalle iperglicemie di pari gravità. Il numero di minuti complessivi rilevati in eventi iperglicemici severi è visivamente maggiore rispetto alla controparte ipoglicemica. Tramite un test statistico, non si sono rilevate differenze significative tra la durata delle ipoglicemie ed iperglicemie nella popolazione analizzata. Viceversa, sono state riscontrate differenze statistiche tra il tempo speso in un evento glicemico e quello trascorso in euglicemia. In particolare, i pazienti rimangono per più tempo in una condizione di *baseline* rispetto ad una situazione glicemica patologica. Come suggerito in uno studio condotto da Galderisi et. al. [36], questa disuguaglianza può essere dovuta all'utilizzo del sensore CGM, il quale emettendo degli allarmi sonori consente il rapido intervento da parte del personale medico per correggere tempestivamente eventuali alterazioni della glicemia. Tuttavia, non avendo a disposizione una popolazione di controllo e non essendo questo lo scopo primario di questa tesi, ulteriori analisi

sono necessarie per valutare l'impatto clinico neonatale dell'utilizzo del sensore di monitoraggio continuo della glicemia.

Un altro aspetto critico del presente lavoro di tesi consiste nella selezione del campione rappresentativo su cui effettuare l'analisi finale. Dei 47 pazienti a disposizione ne sono stati eliminati 30 poiché presentavano almeno un gap temporale critico all'interno della loro acquisizione CGM. Il problema della presenza di questi gap temporali è un aspetto altamente limitante. L'utilizzo del sensore CGM per la misurazione della glicemia ha numerosi vantaggi. Esso è mininvasivo, non interferisce con la strumentazione clinica e non provoca dolore al neonato, aspetto importante poiché è stato dimostrato che una sensazione prolungata di sofferenza può aumentare la probabilità di sperimentare lesioni cerebrali [8]. D'altro canto, il sensore necessita di due calibrazioni giornaliere che, se non vengono effettuate nei tempi previsti, bloccano l'acquisizione del segnale poiché non è più possibile garantire una buona accuratezza dei campioni rilevati. Essendo la terapia intensiva neonatale un ambiente altamente dinamico non è sempre possibile intervenire prontamente per effettuare la calibrazione del dispositivo entro i tempi richiesti. Inoltre, durante la degenza del neonato si può riscontrare la necessità di dover effettuare terapie o esami strumentali che richiedono di rimuovere il sensore interrompendo l'acquisizione. Tutti questi comportamenti causano la comparsa di gap temporali nel segnale CGM. Non potendo agire direttamente nel processo di acquisizione dei dati, l'unica soluzione è operare dal punto di vista computazionale. Sebbene l'algoritmo di correzione utilizzato sviluppato da Fonda et. al. [70] consente di ottenere una previsione accurata del segnale mancante senza peggiorare la qualità delle metriche relative alla variabilità glicemica, esso non può essere applicato in presenza di gap relativamente lunghi. Infatti, un aumento dell'estensione temporale del gap corrisponde ad un aumento della probabilità che in esso si sia sviluppato un evento glicemico non rilevato. Nonostante l'utilizzo di specifiche metriche a base statistica per valutare l'impatto del gap sull'analisi glicemica, si è dovuto inevitabilmente escludere più della metà del database originale, per ridurre possibili *bias* e presentare solo risultati affidabili. In futuri studi potrebbe essere interessante progettare ed utilizzare algoritmi di correzione basati su tecniche di *machine learning* o *deep learning* in modo tale da prevedere con una adeguata precisione il segnale all'interno dei gap temporali. Alla data di pubblicazione di questa tesi non sono stati rilevati studi in letteratura sull'utilizzo di queste strategie di correzione validati su una popolazione neonatale prematura.

Sebbene il problema principale nella fase di selezione del campione rappresentativo sia la presenza di gap temporali, ulteriori pazienti sono stati rimossi dal database per altri motivi. In particolare, 4 neonati sono stati eliminati perché l'acquisizione del tracciato CGM iniziava in

una condizione di evento glicemico. Poiché esso non è completamente rilevato, non è possibile descriverlo interamente per valutare il suo impatto nella variazione di connettività cerebrale. Inoltre, non è possibile stabilire una finestra in euglicemia prima dell'inizio di eventi noti, ovvero misurati dal CGM. Data la presenza di questi eventi iniziali, non è possibile escludere con una adeguata certezza che il paziente non abbia sperimentato altri eventi glicemici importanti prima dell'inizio dell'acquisizione del segnale. Ovviamente non possiamo escluderlo neanche per gli altri pazienti, non avendo a disposizione i valori di glicemia prima dell'inizio del CGM. Possiamo solo supporre che, nei pazienti che iniziano le acquisizioni CGM in euglicemia entro le 48 ore, la variabilità glicemica in questo lasso temporale non misurato sia ridotta. A tal proposito, sebbene sia nota l'elevata instabilità glicemica che caratterizza i primi istanti dopo il parto nei neonati prematuri, questa condizione è stata rilevata anche negli infanti nati a termine ed è causata principalmente dal taglio del cordone ombelicale, e quindi può essere considerata fisiologica nelle prime ore dopo il parto [10]. La differenza fondamentale tra le due popolazioni risiede nel numero di eventi sperimentati nei giorni successivi alla nascita e che possono essere rilevati dal CGM inserito entro le prime 48 ore di vita [11].

Altri 3 pazienti sono stati eliminati a causa di un tempo trascorso al di fuori del range di euglicemia molto ridotto. Sono quindi neonati prematuri che risultano in grado di mantenere un controllo glicemico adeguato, nonostante la prematurità. In questi neonati il calcolo delle principali metriche glicemiche potrebbe non produrre risultati affidabili, data la scarsa variabilità glicemica, per questo motivo abbiamo scelto di escluderli in questa prima analisi effettuata in questa tesi. D'altro canto, sebbene potesse risultare interessante utilizzare questi pazienti come popolazione di controllo per valutare eventuale assenza di variazioni nella connettività tra inizio e fine acquisizione, non è stato possibile effettuarlo dato il loro numero estremamente ridotto.

Infine, altri due neonati sono stati rimossi poiché il tracciato NIRS non conteneva la prima e/o l'ultima finestra di euglicemia rilevata dal sensore CGM. Le due strumentazioni utilizzate non sono in grado di dialogare tra loro e molto spesso, dato l'ambiente dinamico presente in TIN, sono montate sul paziente in momenti diversi della giornata; di conseguenza non è sempre possibile effettuare un'acquisizione contemporanea dei segnali.

Un'osservazione effettuata a posteriori sui risultati ha consentito di recuperare un paziente, regolando la finestra temporale dove avviene l'analisi glicemica in modo tale da escludere l'unico evento critico finale. In definitiva, nonostante la presenza di numerose problematiche nella selezione del campione rappresentativo, la limitazione principale consiste nella presenza

di numerosi gap temporali critici. Infatti, questa è una delle motivazioni principali per cui risulta difficile effettuare ed individuare nella letteratura studi su popolazioni neonatali premature numerose.

Dopo aver valutato il profilo glicemico dei pazienti all'interno del dataset, è stato analizzato il segnale NIRS in modo tale da ottenere le matrici di connettività cerebrale a riposo nelle due migliori finestre all'interno del primo ed ultimo intervallo di euglicemia. Al termine di questo passaggio si otterranno alcune metriche relative alla variazione della matrice rsFC che verranno poi valutate in relazione ai parametri glicemici estratti dal segnale CGM. Fino a non molto tempo fa non esisteva alcuna tecnologia adatta a monitorare per lunghi periodi l'emodinamica cerebrale all'interno della TIN. Infatti, la fMRI non è utilizzabile per un'acquisizione continua in quanto richiede lo spostamento del paziente e la relativa sedazione per evitare artefatti da movimento. Altre strumentazioni, come l'ecografia, non sono utilizzabili in quanto restituiscono informazioni statiche e l'EEG non è efficace per lunghi periodi di acquisizione a causa di una veloce evaporazione del gel conduttivo utilizzato per evitare dispersione del segnale. Con il miglioramento della strumentazione NIRS e la creazione di cuffie ergonomiche che aumentano il confort del paziente per tutta la durata della rilevazione, si è finalmente potuta utilizzare la NIRS per il monitoraggio continuo bordo-culla. Inoltre, l'approccio multicanale permette di valutare l'emodinamica in aree diverse del cervello, ipotizzando che le variazioni glicemiche possono alterare in maniera diversa la connettività cerebrale in base alla zona coinvolta. Per questo motivo la combinazione delle informazioni relative all'emodinamica cerebrale e del profilo glicemico dei neonati prematuri arruolati in questo studio, rende il database a disposizione unico al mondo e rappresenta il grande vantaggio del progetto "BabyGlucoLight". In questo modo è possibile analizzare le conseguenze degli eventi glicemici a livello cerebrale aprendo la strada alla realizzazione di numerosi studi sulla prematurità, lo sviluppo cerebrale e il suo legame con la disponibilità di glucosio.

L'analisi dei tracciati NIRS risulta tuttavia più complessa rispetto a quella del CGM poiché le misure di natura ottica sono facilmente affette sia da rumore di misura che di tipo fisiologico. Prima di calcolare la rsFC è stato necessario effettuare un'attenta fase di *preprocessing* dei segnali in modo tale da eliminare la componente spuria senza alterare le informazioni di interesse. Data la mancanza di un protocollo univoco sono stati testati diversi approcci specifici per studi sulla connettività cerebrale, come quello proposto da Yang et al. [75]. Come riportato nel capitolo 2.4.3, questo metodo consiste nell'applicare in cascata una sostituzione tramite *Spline* e rumore bianco gaussiano della porzione di tracciato contaminata da artefatti da movimento. Tramite un'ispezione visiva si è riscontrato un aumento del *bias* nei risultati,

soprattutto in corrispondenza di segnali nei quali sono presenti numerosi e frequenti artefatti da movimento. Per poter ottenere dei risultati il più possibile confrontabili e riproducibili si è quindi deciso di utilizzare l'approccio standard basato sulla trasformata Wavelet che consente di raggiungere dei buoni esiti in relazione alla natura degli artefatti da movimento che corrompono il segnale a nostra disposizione. Infatti, un recente lavoro sottomesso alla rivista *Human Brain Mapping*, sembra dimostrare che, per studi di rsFC tramite NIRS, il filtraggio Wavelet con iqr pari a 1.2 consente di ottenere dei buoni risultati se nel dataset sono presenti prevalentemente artefatti di tipo *spike* [77].

In una popolazione adulta è buona norma effettuare la rimozione del rumore fisiologico attraverso una regressione statistica utilizzando il segnale acquisito dai cosiddetti canali “*Short-Separation*” (SS). Essi consistono in una coppia sorgente-rilevatore posizionata a breve distanza in grado di rilevare solamente la componente emodinamica relativa ai tessuti extracerebrali. Tuttavia, in questo lavoro di tesi non è stata effettuata poiché nei neonati la componente fisiologica extracerebrale rilevata tramite NIRS risulta incidere meno sul segnale utile acquisito, rispetto alla popolazione adulta, dato il limitato spessore dei tessuti cerebrali e la contenuta circonferenza cranica [86]. Inoltre, in questo studio l'utilizzo dei canali SS è impraticabile da un punto di vista hardware poiché servirebbero sorgenti e rilevatori posizionati ad una distanza di 2 mm, come suggerito in uno studio condotto da Brigadoi et al. [60]. La procedura adottata appena descritta è supportata dalla presenza di alcuni studi in letteratura nei quali viene eseguita la rsFC in neonati senza la rimozione del rumore fisiologico, ottenendo in egual modo dei risultati privi di *bias* [75], [87], [88]. È utile sottolineare che alcune cuffie NIRS ad alta densità presenti da poco in commercio supportano l'utilizzo dei canali SS ed alcuni progetti stanno iniziando ad applicarla anche in ambiente neonatale [55], [89]; tuttavia, ulteriori studi sono necessari per validarne l'utilizzo soprattutto su popolazioni premature.

Per quanto riguarda il processo utilizzato per effettuare l'analisi della funzionalità cerebrale a riposo non sono state riscontrate particolari problematiche. In quasi tutti i pazienti la composizione dell'array dei canali attivi che caratterizzano la migliore finestra di cinque minuti identificata in euglicemia consente di ottenere una buona sensibilità e copertura della corteccia cerebrale. Eccezion fatta per il paziente numero 14 nel quale due ROI sono state escluse nella finestra iniziale di euglicemia poiché il segnale misurato sullo scalpo non era sufficientemente sensibile a tali aree. Dato che questa esclusione non si ripercuote in maniera significativa sulla qualità dei risultati ottenuti e per non eliminare un ulteriore paziente dal database, si è deciso di considerarlo ugualmente scartando le ROI in questione.

Tramite un'analisi visiva delle matrici rsFC ottenute si è notato che coppie di ROI appartenenti alle stesse aree cerebrali risultavano particolarmente correlate positivamente. Si è quindi deciso di indagare questo aspetto contando il numero di coppie di ROI intralobo con un coefficiente di correlazione maggiore di 0.5. Si è riscontrato che effettivamente il segnale tra ROI centrali e laterali risulta essere particolarmente correlato all'interno dello stesso lobo (Frontale, Motorio e Parietale); in maniera più marcata per HbO ma lo stesso pattern di attivazione è stato rilevato anche in HbR. Questo risultato conferma la bontà delle matrici calcolate poiché è coerente con quanto affermato negli studi di rsFC presenti in letteratura in quanto ci si aspetta che il segnale rilevato in aree cerebrali vicine all'interno dello stesso lobo sia fortemente correlato positivamente in condizioni di riposo [55].

Poiché si deve calcolare la differenza tra le matrici di rsFC rilevate nelle due finestre di euglicemia ad inizio e fine acquisizione si è valutato se statisticamente vi sono delle alterazioni della connettività cerebrale tra gli estremi dell'intervallo analizzato. A tal proposito si sono contate le coppie di ROI per ogni paziente che hanno subito una variazione di correlazione tra i due istanti temporali, valutando diverse soglie. Si è riscontrato che in tutti i pazienti il coefficiente di correlazione di almeno un quarto delle coppie di ROI varia in valore assoluto per almeno il 25%. Un numero ridotto invece va incontro ad una variazione assoluta di più del 50%, corrispondente ad un cambio di segno della correlazione. Questi risultati qualitativi, tuttavia, non sono supportati dall'analisi statistica, la quale ha rilevato solamente la coppia Fz-Pz per HbR con differenze significative nei coefficienti di correlazione. Si deve sottolineare che questa analisi è fortemente limitata dal numero ridotto di pazienti a disposizione. Non è da escludere che in presenza di una popolazione più ampia si possano rilevare differenze significative, a fronte della presenza di numerosi studi in letteratura che descrivono l'accoppiamento neurovascolare mettendo in relazione l'attività neurale con l'apporto di ossigeno e glucosio [43].

Verranno ora discussi i risultati ottenuti tramite l'analisi della correlazione tra le metriche glicemiche e le variazioni della connettività funzionale cerebrale a riposo. È importante sottolineare l'estrema mancanza di studi scientifici presenti in letteratura su tali argomenti e, inoltre, le informazioni che si trovano sono spesso discordanti. Per questo motivo è stata effettuata una prima indagine esplorativa valutando tutte le correlazioni statisticamente rilevanti ottenute prendendo in considerazione il livello standard di significatività ($p\text{-value} < 0,05$). I risultati ottenuti sono stati esaminati sia da un punto di vista delle metriche glicemiche, raggruppando le correlazioni significative tra parametri appartenenti allo stesso gruppo, sia per posizione spaziale e relazione tra coppie di ROI.

Per quanto riguarda le metriche glicemiche basate sulla statistica descrittiva sono state rilevate solamente correlazioni negative tra le alterazioni della connettività cerebrale a riposo riferita ad HbR e il valore minimo assunto dalla glicemica all'interno dell'intervallo di acquisizione CGM. Viceversa, il valore massimo di glucosio rilevato è in relazione positiva con la differenza di rsFC per HbR in tutte le correlazioni significative rilevate. Questo risultato è coerente con le nostre aspettative in quanto è ragionevole aspettarsi che ad una diminuzione del valore glicemico corrisponda un aumento della differenza di connettività cerebrale e che viceversa un aumento di tale valore incrementi le alterazioni di rsFC, sotto l'ipotesi che la connettività nella finestra iniziale possa considerarsi quella target. Inoltre, a supporto di queste affermazioni vi sono alcuni studi, riportati nella sezione di analisi della letteratura, nei quali si è riscontrato un aumento delle lesioni cerebrali in corrispondenza di eventi glicemici [14], [21], [24], [25]. La variazione di connettività nella finestra finale rispetto a quella iniziale potrebbe indicare sofferenza di alcune aree cerebrali conseguente alla variabilità glicemica intercorsa tra i due periodi temporali. Nessun pattern ricorrente è stato rilevato per quanto riguarda il segnale HbO e queste metriche. Tra le correlazioni statisticamente significative si sono valutati i risultati ottenuti in relazione ai parametri di dispersione statistica del segnale CGM come deviazione standard, *Median Absolute Difference* e il range interquartile. La SD è in correlazione positiva con la differenza del segnale in 5 coppie di ROI per HbR mentre una sola per HbO. Il numero decresce visibilmente per quanto riguarda la MAD (due coppie HbO, una HbR) e IQR (due coppie sia per HbO che HbR). Si è osservato che in tutte le metriche sopracitate vi è una coppia di ROI in correlazione positiva ricorrente, F3-F4 per HbO e Fz-F4 per HbR. Dunque, ad un aumento della SD, MAD o dell'IQR si può osservare un aumento della differenza della connettività cerebrale a riposo tra la coppia F3-F4 per HbO e Fz-F4 per HbR. Questo risultato è interessante poiché sebbene tutte le metriche sopracitate forniscano informazioni sul grado di dispersione del segnale CGM, esse fanno riferimento ad indici statistici differenti. In particolare, la SD indica la distanza dei valori dalla media mentre MAD e IQR sono riferite alla mediana, la quale risulta per definizione meno sensibile ad eventuali *outliers*. Per questo motivo è ragionevole ipotizzare che la differenza di segnale rilevata nella coppia F3-F4 (HbO) e in Fz-F4 (HbR) aumenta in corrispondenza ad un aumento della dispersione dei dati glicemici acquisiti dal sensore CGM. Inoltre, il numero maggiore di correlazioni significative osservate in SD può essere dovuto alla presenza di *outliers* nel segnale CGM, i quali non influiscono sulle altre metriche riferite alla mediana in quanto più robuste. I risultati preliminari ottenuti al termine di questa prima analisi suggeriscono che il lobo frontale possa essere maggiormente soggetto a variazioni di connettività cerebrale in relazione ad una alterazione delle metriche glicemiche basate sulla statistica descrittiva, sia per HbO che per HbR.

In riferimento alle metriche basate sulla durata e natura degli eventi glicemici si possono effettuare meno considerazioni in quanto il numero di correlazioni significative è molto ridotto e spesso quelle rilevate fanno riferimento solamente ad HbO o HbR. È stato riscontrato che il numero di eventi di ipoglicemia normalizzato è in relazione positiva con la differenza di correlazione in HbO rilevata nella coppia Fz-Pz. Gli stessi risultati, ma con segno negativo, sono stati osservati per il numero di eventi di iperglicemia normalizzato. Questo risultato suggerisce che la differenza in correlazione nel segnale HbO tra Fz-Pz (facente parte del network fronto-parietale) aumenta con l'incremento delle ipoglicemie e diminuisce in relazione alle iperglicemie, indicando quindi che la tipologia di evento glicemico potrebbe avere un diverso impatto sulla connettività tra regioni. È utile ricordare che nell'analisi statistica della differenza tra le matrici di rsFC nei due istanti temporali rilevati si era ottenuto come unico risultato un'alterazione significativa per la medesima coppia relativa, però, al solo segnale HbR. Sebbene vi sia una differenza nella tipologia di emoglobina, è ragionevole ipotizzare che in presenza di una popolazione più numerosa si possano trovare risultati concordi tra le differenze statistiche della rsFC e un suo aumento in relazione ad eventi ipoglicemici per entrambe i cromofori. Un comportamento simile si è riscontrato per le metriche relative al tempo percentuale trascorso in euglicemia ed al di fuori di essa. In particolare, un aumento del TIR% corrisponde ad un aumento della differenza di connettività nel segnale HbO rilevato nella coppia Fz-Cz e C4-P3 mentre un aumento del TOR% corrisponde ad una diminuzione dell'alterazione della connettività cerebrale nella stessa coppia di ROI. Questo comportamento è giustificato dal fatto che le metriche glicemiche TIR% e TOR% sono complementari e può essere utilizzato come indice di bontà dei risultati ottenuti.

Più interessanti sono i risultati ottenuti dalla correlazione con le metriche che si riferiscono alla variabilità glicemica. Comportamenti simili sono stati riscontrati sia per HbO ed HbR in relazione alle metriche che valutano la variabilità glicemica intragiornaliera calcolata in intervalli temporali diversi (CONGA 1 ora, 2 ore e 4 ore). In particolare, è stato identificato lo stesso pattern di correlazioni in CONGA 1 e CONGA 2 mentre cambia completamente in CONGA 4. Si può presupporre, quindi, che una variabilità glicemica intragiornaliera nell'arco di sole 4 ore possa provocare delle alterazioni della connettività cerebrale. Non sono stati osservati pattern simili tra la variabilità glicemica intragiornaliera ed intergiornaliera (CONGA vs MODD). Per quanto riguarda le metriche che si riferiscono alla variabilità dell'intero segnale CGM risultati interessanti sono stati ottenuti con l'*Absolute Average Rate of Change*, la sua relativa standard deviation (SDRC) e il coefficiente di variazione. In particolare, in tutti e tre i casi vi è una forte correlazione positiva con la differenza in connettività nel segnale HbR per la

coppia di ROI F3-P3 (facente parte del network fronto-parietale di sinistra). In altre parole, un aumento della variabilità glicemica corrisponde ad un aumento della differenza della connettività cerebrale in F3-P3. Questo risultato è di particolare interesse poiché non solo è presente per l'AARC del segnale CGM, ma è riscontrato anche per il suo specifico indice di dispersione (SDRC), confermandone e rafforzandone la relazione. Inoltre, è utile riportare che si è osservata la medesima correlazione positiva tra i segnali HbR P3-P4 e F4-C3 con SDRC e la variabilità glicemica intragiornaliera calcolata in una finestra temporale di 4 ore (CONGA 4). Dunque, ad un aumento del SDRC o del CONGA 4 corrisponde un aumento della differenza in termini di connettività cerebrale tra le coppie P3-P4 e F4-C3 per il segnale HbR. Ottenere gli stessi risultati anche in riferimento all'indice di dispersione irrobustisce le ipotesi formulate per CONGA 4.

Riassumendo, al termine dell'analisi esplorativa della correlazione tra le metriche glicemiche e le variazioni della connettività funzionale a riposo sono state rilevate 24 correlazioni riferite ai segnali HbO e 39 per la controparte HbR. Con i dati a nostra disposizione, si è riscontrato che la variabilità glicemica provoca maggiori alterazioni della rsFC per l'emoglobina deossigenata rispetto a quella ossigenata.

È stata rilevata una parziale discordanza nei risultati ottenuti all'interno della stessa metrica glicemica tra HbO ed HbR. In particolare, vi è un numero limitato di confronti nei quali si può osservare un pattern simile tra le correlazioni rilevate per i due cromofori. La causa di questa differenza può essere ricercata nel mancato completo sviluppo dell'accoppiamento neurovascolare nei neonati prematuri. In un cervello adulto sano, come riportato nel paragrafo 1.4, è ben noto che ad un aumento dell'attività neurale corrisponde un incremento del flusso ematico cerebrale in quella zona. L'afflusso di sangue arterioso eccede il consumo effettivo di ossigeno richiesto dal tessuto, inducendo di conseguenza un aumento localizzato dell'emoglobina ossigenata ed una relativa diminuzione della controparte deossigenata. Tuttavia, la risposta emodinamica cerebrale osservata in un neonato prematuro può essere diversa a causa di un mancato completo sviluppo delle componenti vascolari essenziali che regolano l'accoppiamento neurovascolare (astrociti e periciti). Inoltre, è stato dimostrato che questo processo è in costante sviluppo nei primi anni di vita e di conseguenza anche la richiesta metabolica del neonato può cambiare, inducendo variazioni nella risposta emodinamica rilevata tramite le varie tecniche di *imaging* cerebrale [41]. Questa breve spiegazione può chiarire il motivo per cui abbiamo riscontrato un disallineamento nei risultati tra HbO ed HbR nella nostra analisi, senza mettere in discussione l'affidabilità dei dati, che potrebbero essere diversi in una popolazione adulta, sana e completamente sviluppata. Inoltre, l'utilizzo della NIRS per

indagare l'accoppiamento neurovascolare consente di studiare separatamente il comportamento di HbO ed HbR, fornendo informazioni diverse e complementari che non si possono ottenere tramite altre tecniche di *imaging* cerebrale funzionale come, ad esempio, la fMRI.

È utile ora analizzare questa tipologia di risultati dal punto di vista delle ROI. È stato rilevato che per il segnale HbO il maggior numero di correlazioni riscontrate sono quelle in relazione alla coppia F3-F4. In particolare, 3 con metriche glicemiche basate sulla statistica descrittiva (SD, MAD, IQR) e una in riferimento alla variabilità del segnale CGM (SDRC). Più interessanti sono i risultati ottenuti per l'emoglobina deossigenata. In particolare, si è riscontrato che la coppia con un maggior numero di correlazione è F3-P3 con ben 6 relazioni, 5 delle quali in riferimento a metriche basate sulla variabilità glicemica (CV, AARC, SDRC, CONGA 2 e CONGA 4) e 1 sulla statistica descrittiva (SD). Sembra quindi esserci un'interessante relazione tra la differenza di segnale in queste aree e la variabilità glicemica, con l'area cerebrale localizzata in F3 che sembrerebbe essere un *seed* interessante per valutare queste differenze. Sebbene le informazioni in letteratura scarseggino, un interessante studio condotto da Sharma et. al. [14] ha osservato una maggiore frequenza di lesioni cerebrali nelle aree parietali ed occipitali in neonati prematuri che possono essere provocate dall'esposizione continua e ripetuta ad eventi di natura glicemica. Nel nostro studio si possono ottenere informazioni solamente sulla zona parietale poiché, per garantire un discreto confort al paziente, si è deciso di evitare di posizionare sorgenti/rilevatori NIRS nell'area occipitale. In particolare, si sono osservate 14 correlazioni per il segnale HbO e 21 per HbR che coinvolgono almeno una ROI parietale (P3, Pz o P4). In entrambi i casi, il numero supera la metà delle correlazioni significative rilevate. Sebbene sia di fondamentale importanza sottolineare che una lesione anatomica presente in un'area cerebrale non sempre si ripercuote in un'alterazione della connettività funzionale della medesima, aver riscontrato più della metà delle correlazioni significative che coinvolgono una ROI posizionata sul lobo parietale può presupporre la presenza di una lesione in questa zona, o comunque un suo coinvolgimento o sofferenza. Ulteriori analisi, utilizzando strumentazioni specifiche come la risonanza magnetica strutturale o quella a diffusione (dMRI), sono necessarie per indagare una possibile relazione tra la posizione anatomica precisa dei danni cerebrali ed eventuali alterazioni provocate nella connettività cerebrale a riposo.

A fronte dei risultati ottenuti tramite l'analisi esplorativa si è proceduto ad una fase di correzione dei risultati per confronti multipli. Questo step è necessario per evitare eventuali errori di tipo 1 e 2 che possono essere stati introdotti dal numero elevato di comparazioni effettuate. Come riportato nel paragrafo 2.6 al termine di questo passaggio, effettuato con

diversi metodi statistici più o meno rigidi, si sono rilevate solamente due correlazioni significative per l'emoglobina deossigenata. Sebbene questo fosse stato preventivato, data la dimensionalità ristretta del database a nostra disposizione, i risultati ottenuti sono comunque interessanti. In particolare, gli unici confronti che sono sopravvissuti a questa fase sono quelli relativi all'AARC e al CV per la coppia di ROI F3-P3. Queste due metriche glicemiche differiscono per formulazione ma fanno riferimento entrambe alla variabilità glicemica del segnale CGM. Aver trovato una correlazione positiva tra questi due parametri con egual coefficiente r e con un p -value tale da supportare la correzione per confronti multipli, fa sì che si possa affermare con ragionevole sicurezza che effettivamente vi è una relazione tra la variabilità glicemica sperimentata dai neonati pretermine, contenuti nel dataset, e le alterazioni della connettività cerebrale a riposo rilevate nella coppia di ROI F3-P3. In altre parole, un aumento dell'instabilità glicemica è relazionata con un aumento della differenza di segnale HbR rilevato in F3-P3. Ulteriori analisi su un campione più numeroso sono necessarie per valutarne l'impatto in riferimento all'intero cervello. Tuttavia, data l'estrema mancanza di studi in letteratura, la presenza di tale relazione può supportare eventuali future indagini per aumentare la conoscenza sul possibile legame tra la glicemia e l'emodinamica cerebrale nei neonati prematuri.

Questo studio, tuttavia, non è esente da alcune limitazioni che verranno ora discusse nel dettaglio. Il numero ristretto di pazienti analizzati è il problema principale che caratterizza questo lavoro di tesi. La presenza di gap temporali critici all'interno del segnale CGM, che non possono essere adeguatamente corretti, ha comportato l'esclusione di più della metà del dataset a nostra disposizione. L'algoritmo proposto per l'interpolazione del segnale è limitato dall'estensione temporale dei gap, diminuendo la precisione della stima all'aumentare del numero di campioni mancanti. Di conseguenza, è stato necessario definire alcune metriche statistiche stringenti in grado di valutare l'impatto dei gap temporali critici sulla bontà delle successive analisi statistiche, portando inevitabilmente ad una massiccia esclusione di pazienti. Anche la tecnologia utilizzata in questo studio ha delle limitazioni rilevanti. Il sensore CGM necessita di due calibrazioni al giorno che, se non vengono effettuate entro i termini previsti, provocano dei gap temporali all'interno del segnale. Inoltre, per effettuare questa procedura è necessario prelevare un campione di sangue dal tallone tramite puntura, la quale risulta particolarmente dolorosa per il neonato prematuro. Anche la cuffia NIRS ha delle limitazioni. Nonostante sia completamente non invasiva e sia stata progettata per essere biocompatibile, per aumentare il confort del paziente si sono rimossi alcuni optodi soprattutto nella zona occipitale e laterale. In questo modo, però, non è possibile ottenere informazioni relative all'emodinamica

di quelle zone cerebrali. L'utilizzo della NIRS, a differenza della fMRI, consente di effettuare veloci acquisizioni bordo-culla e permette una maggiore libertà di movimento al neonato. Tuttavia, la ridotta risoluzione spaziale di tale procedura può essere una limitazione. Inoltre, non consentendo l'acquisizione di immagini anatomiche, necessita l'utilizzo di un atlante per mappare le variazioni di segnale rilevato sullo scalpo con alterazioni dell'emodinamica cerebrale a livello corticale. In letteratura sono presenti alcuni database neonatali contenenti modelli cerebrali ottenuti tramite media di immagini MRI classificati in base alla settimana di gestazione, come, ad esempio, quello specifico per la prematurità adottato in questa tesi [73]. Sebbene sia possibile utilizzare l'atlante che più si avvicina alle caratteristiche fisiche del paziente in analisi, si deve tenere in considerazione che esso è calcolato sulla base di una media di più soggetti con caratteristiche diverse. Di conseguenza non è possibile eliminare la variabilità inter-soggetto (*Inter-subject Variability*) come avviene nella fMRI dove si hanno a disposizione le scansioni anatomiche paziente-specifiche. Tuttavia, è utile sottolineare che l'utilizzo di atlanti neonatali classificati in base alla settimana di gestazione consente di ottenere comunque dei buoni risultati. La strumentazione NIRS utilizzata è a fibra ottica, di conseguenza in lunghe acquisizioni la probabilità che vi sia un'alterazione dell'accoppiamento optode-scalpo aumenta. Se ciò accade, come è stato rilevato in questa tesi, la luce della TIN o di altre strumentazioni può corrompere il segnale acquisito producendo un tracciato troppo regolare e non informativo. Sebbene sia stata effettuata un'analisi spettrale per rimuovere queste componenti è doveroso ricordare che più si modificano i dati a disposizione più è possibile introdurre errori che possono produrre *bias* nei risultati. Inoltre, in questo lavoro di tesi l'analisi spettrale è stata effettuata impostando le diverse soglie statistiche tramite ispezione visiva dei tracciati. Questa procedura può risultare subottimale ed è possibile attuarla solamente in presenza di pochi pazienti. Tuttavia, il controllo qualitativo dei risultati non ha evidenziato particolari criticità. Dal punto di vista statistico si sono utilizzate le metodologie il più possibile adeguate e robuste, tenendo in considerazione il numero ridotto di pazienti a nostra disposizione. Tuttavia, è utile ricordare che in analisi di correlazione la dimensione del dataset influisce nella precisione dei risultati. Non è possibile escludere, quindi, che vi siano altre relazioni non rilevate tra la variabilità glicemica e l'alterazione della connettività cerebrale. Nonostante ciò, i risultati esplorativi ottenuti sono comunque supportati da una buona significatività statistica. Infine, è importante sottolineare la scarsa presenza di studi sull'emodinamica cerebrale dei neonati prematuri e la conoscenza sulla gestione del glucosio in questi pazienti è fortemente limitata. Di conseguenza, non è stato sempre possibile valutare ed interpretare i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi in relazione con le informazioni presenti in letteratura. Per questo motivo, quest'analisi preliminare ed esplorativa potrà

supportare nuovi studi per valutare l'impatto della gestione del glucosio sull'emodinamica cerebrale e sul neurosviluppo dei neonati prematuri.

Per concludere è necessario discutere brevemente alcuni possibili sviluppi futuri relativi a questo progetto. Come più volte sottolineato il problema principale riscontrato in questa tesi è la presenza di gap temporali critici nel segnale CGM. Per limitare la loro comparsa si potrebbe agire sia dal lato software che hardware. Nel primo caso si potrebbero sviluppare avanzati algoritmi di *Machine Learning* o *Deep Learning* per cercare di stimare in maniera accurata i campioni mancanti, a prescindere dall'estensione del gap temporale, riuscendo di conseguenza a recuperare ulteriori pazienti e aumentando la precisione statistica delle analisi effettuate. Dal lato hardware, invece, lo sviluppo di sensori CGM in grado di auto-calibrarsi potrebbero essere in grado di risolvere il problema dei gap temporali. Tuttavia, è utile ricordare che alla data di pubblicazione di questa tesi nessun sensore con questa tecnologia è stato approvato o testato per uso neonatale. Anche il protocollo di acquisizione dei dati può essere rivisto. È noto che utilizzare formati e nomenclature diverse per l'archiviazione dei dati può aumentare le probabilità di commettere errori durante le fasi successive di analisi. È utile quindi procedere ad una catalogazione delle informazioni adoperando procedure e nomi standard per ridurre il tempo necessario al caricamento dei dati e, soprattutto, per evitare di introdurre errori dovuti ad una eccessiva manipolazione dei dati. Nel paragrafo precedente si sono discussi i problemi riscontrati nell'utilizzo della strumentazione NIRS a nostra disposizione. Per futuri studi si potrebbe valutare l'utilizzo di apparecchiature NIRS *wireless* e *fiberless* le quali sono in grado, non solo di aumentare il confort del neonato, ma consentono anche di rilevare informazioni relative a tutte le zone cerebrali, compreso il lobo occipitale. Inoltre, alcune strumentazioni di ultima generazione consentono l'utilizzo dei canali SS per la regressione del rumore fisiologico [55]. Questa tipologia di cuffia consente di migliorare l'accoppiamento optodo-scalpo, riducendo la probabilità di avere contaminazioni del segnale dovute ad infiltrazioni della luce proveniente dalla TIN o da altri macchinari. Nonostante ciò, prima di poter utilizzare una strumentazione NIRS di questo tipo, è utile valutarne l'applicabilità e l'efficacia nei neonati; nonché costruire una nuova cuffia biocompatibile, sicura e specifica per le varie circonferenze craniche dei pazienti. Per la correzione degli artefatti da movimento si può valutare l'utilizzo di alcuni accelerometri in grado di quantificare i movimenti effettuati dal paziente in modo tale da utilizzarli come regressori durante la fase di *preprocessing* del segnale [90]. Anche in questo caso sono necessari ulteriori studi prima di poter applicare questa strategia in ambiente neonatale. Per quanto riguarda l'analisi della connettività cerebrale a riposo uno studio recente di Uchitel et al. [55], più volte citato nel corso di questa tesi, ha valutato i risultati ottenuti

applicando diverse metodologie in una popolazione neonatale a termine. Oltre ad un approccio *seed based*, utilizzato anche nel nostro caso, è stata proposta un'analisi della connettività tramite parcellizzazione corticale in grado di rilevare le relazioni funzionali tra emisferi sfruttando la teoria dei grafi. Un altro interessante metodo statistico *data-driven* citato in questo *paper* consiste nella *Connectome Based ICA*, la quale consente di individuare i *resting state network*, valutandone eventuali alterazioni. Queste analisi avanzate non sono state effettuate nel presente lavoro di tesi per questioni di tempo. Tuttavia, i risultati preliminari ottenuti possono fornire un supporto per futuri studi, nei quali si potrebbe valutare l'utilizzo di queste metodologie di rsFC nella popolazione neonatale prematura a disposizione, al fine di indagare specificamente le aree cerebrali coinvolte nella relazione con l'alterazione della variabilità glicemica.

CONCLUSIONI

In questa tesi si sono analizzati i dati relativi alla glicemia e all'emodinamica cerebrale di neonati prematuri rilevati durante la loro prima settimana di vita. Data l'estrema difficoltà nell'acquisire dati sufficientemente informativi in popolazioni con queste caratteristiche, gli studi presenti in letteratura sulla prematurità e le variazioni glicemiche ed emodinamiche che avvengono durante i primi giorni di vita in questa popolazione sono molto limitati e spesso discordanti tra loro. Solo di recente si è iniziato ad utilizzare sensori indossabili e tecniche ottiche di acquisizione dell'emodinamica cerebrale che consentono di ottenere un'ampia gamma di dati continui in maniera non invasiva direttamente a "bordo-culla". Il database creato durante il progetto "*BabyGlucoLight*" risulta essere unico al mondo e combina misure glicemiche, rilevate tramite sensore CGM, con segnali di emodinamica cerebrale ottenuti tramite strumentazione NIRS. Questo progetto ha come scopo finale indagare le conseguenze neurocognitive nei primi anni di vita dovute ad una alterazione del sistema di compensazione del glucosio e del suo impatto sull'emodinamica cerebrale nei primi giorni dopo il parto. In questo lavoro di tesi, ho usato questo dataset per indagare la relazione tra la variabilità glicemica e l'alterazione della connettività cerebrale a riposo, valutate entrambe durante la prima settimana di vita, nei neonati molto prematuri presenti all'interno del dataset.

Al termine dell'analisi glicemica preliminare effettuata sull'intero database si sono ottenuti risultati sulla frequenza degli eventi in linea con le informazioni presenti in letteratura. Anche un'analisi qualitativa delle differenze tra le matrici di connettività cerebrale ha evidenziato una effettiva alterazione delle matrici rsFC. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per valutare la significatività statistica di questi risultati, dato il ridotto campione qui disponibile.

Per quanto riguarda l'analisi principale effettuata in questo lavoro di tesi si sono ottenuti dei risultati in accordo con quanto atteso. Nonostante un numero elevato di pazienti esclusi dal campione per la presenza di gap temporali critici nel segnale CGM, si è rilevato un numero sufficiente di correlazioni statisticamente significative tra alcune metriche relative alla variabilità glicemica e le differenze della matrice rsFC (24 per HbO e 39 per HbR). Di queste, la maggior parte si riferiscono a segnali che coinvolgono almeno una ROI posizionata sul lobo

parietale. Questo esito è in accordo con quanto riportato in letteratura dove si presuppone una relazione tra gli eventi glicemici postnatali e la comparsa di lesioni cerebrali nell'area parietale. Al termine dell'analisi esplorativa si sono osservate spiccate correlazioni positive tra la differenza di rsFC tra la coppia di ROI F3-P3 per HbR con metriche specifiche della variabilità del segnale CGM, in particolare con AARC e CV. Questo risultato è di notevole interesse poiché i due parametri glicemici si riferiscono allo stesso fenomeno ma con formulazioni differenti. Queste due correlazioni sono state confermate anche in seguito alla correzione per confronti multipli, validando la forte relazione riscontrata. Si può dunque concludere che nella popolazione analizzata vi è un'importante correlazione statisticamente significativa tra la variabilità glicemica e le alterazioni della connettività cerebrale per HbR nella coppia di ROI F3-P3. Il coinvolgimento del network fronto-parietale è interessante in quanto molte funzioni cognitive, legate ad attenzione e memoria, sono note essere supportate da questo network [91]. La valutazione degli esiti del neurosviluppo in questi pazienti, valutato a 12 e 24 mesi di età corretta, come previsto nel protocollo "*BabyGlucoLight*", potrebbe indicare interessanti deficit attentivi o mnemonici correlati con la variabilità glicemica e il suo impatto su F3-P3 durante la prima settimana di vita.

Lo studio effettuato in questo lavoro di tesi risulta essere unico nel suo genere e i risultati ottenuti, seppur limitati, possono essere utilizzati come base per future analisi utili a descrivere e controllare in maniera dettagliata il metabolismo del glucosio, nonché per valutare l'impatto delle variazioni emodinamiche e glicemiche alla nascita sugli effetti neurocognitivi a lungo termine.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. R. Silva, “Newborn Mortality,” Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO).
- [2] H. Blencowe *et al.*, “National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications,” *The Lancet*, vol. 379, no. 9832, pp. 2162–2172, Jun. 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)60820-4.
- [3] M. S. Harrison and R. L. Goldenberg, “Global burden of prematurity,” *Semin Fetal Neonatal Med*, vol. 21, no. 2, pp. 74–79, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.siny.2015.12.007.
- [4] P. Steer, “The epidemiology of preterm labour,” *BJOG*, vol. 112, no. s1, pp. 1–3, Mar. 2005, doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00575.x.
- [5] S. Chawanpaiboon *et al.*, “Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis,” *Lancet Glob Health*, vol. 7, no. 1, pp. e37–e46, Jan. 2019, doi: 10.1016/S2214-109X(18)30451-0.
- [6] S. R. Walani, “Global burden of preterm birth,” *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, vol. 150, no. 1, pp. 31–33, Jul. 2020, doi: 10.1002/ijgo.13195.
- [7] M. J. Platt, “Outcomes in preterm infants,” *Public Health*, vol. 128, no. 5, pp. 399–403, May 2014, doi: 10.1016/j.puhe.2014.03.010.
- [8] J. L. Y. Cheong, A. C. Burnett, K. Treyvaud, and A. J. Spittle, “Early environment and long-term outcomes of preterm infants,” *J Neural Transm*, vol. 127, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2020, doi: 10.1007/s00702-019-02121-w.
- [9] A. Le Compte *et al.*, “Modeling the glucose regulatory system in extreme preterm infants,” *Comput Methods Programs Biomed*, vol. 102, no. 3, pp. 253–266, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.cmpb.2010.05.006.

- [10] M. Ward Platt and S. Deshpande, "Metabolic adaptation at birth," *Semin Fetal Neonatal Med*, vol. 10, no. 4, pp. 341–350, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.siny.2005.04.001.
- [11] D. Mitanchez, "Glucose Regulation in Preterm Newborn Infants," *Horm Res Paediatr*, vol. 68, no. 6, pp. 265–271, 2007, doi: 10.1159/000104174.
- [12] J. Girard, "Gluconeogenesis in Late Fetal and Early Neonatal Life," *Neonatology*, vol. 50, no. 5, pp. 237–258, 1986, doi: 10.1159/000242605.
- [13] A. A. M. W. Van Kempen *et al.*, "Adaptation of Glucose Production and Gluconeogenesis to Diminishing Glucose Infusion in Preterm Infants at Varying Gestational Ages," *Pediatr Res*, vol. 53, no. 4, pp. 628–634, Apr. 2003, doi: 10.1203/01.PDR.0000054733.13366.AF.
- [14] A. Sharma, A. Davis, and P. S. Shekhawat, "Hypoglycemia in the preterm neonate: etiopathogenesis, diagnosis, management and long-term outcomes," *Transl Pediatr*, vol. 6, no. 4, pp. 335–348, Oct. 2017, doi: 10.21037/tp.2017.10.06.
- [15] J. M. Hawdon, M. P. Ward Platt, and A. Aynsley-Green, "Patterns of metabolic adaptation for preterm and term infants in the first neonatal week.," *Arch Dis Child*, vol. 67, no. 4 Spec No, pp. 357–365, Apr. 1992, doi: 10.1136/adc.67.4_Spec_No.357.
- [16] H. S. Dweck, Y. W. Brans, J. E. Sumners, and G. Cassady, "Glucose Intolerance in Infants of Very Low Birth Weight," *Neonatology*, vol. 30, no. 1–4, pp. 261–267, 1976, doi: 10.1159/000240930.
- [17] D. Mitanchez-Mokhtari, N. Lahlou, F. Kieffer, J.-F. Magny, M. Roger, and M. Voyer, "Both Relative Insulin Resistance and Defective Islet β -Cell Processing of Proinsulin Are Responsible for Transient Hyperglycemia in Extremely Preterm Infants," *Pediatrics*, vol. 113, no. 3, pp. 537–541, Mar. 2004, doi: 10.1542/peds.113.3.537.
- [18] P. B. Iynedjian, D. Jotterand, T. Nospikel, M. Asfari, and P. R. Pilot, "Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, no. 36, pp. 21824–21829, Dec. 1989, doi: 10.1016/S0021-9258(20)88258-1.

- [19] N. M. van der Lugt, V. E. Smits-Wintjens, P. H. van Zwieten, and F. J. Walther, “Short and long term outcome of neonatal hyperglycemia in very preterm infants: a retrospective follow-up study,” *BMC Pediatr*, vol. 10, no. 1, p. 52, Dec. 2010, doi: 10.1186/1471-2431-10-52.
- [20] S. Ramel and R. Rao, “Hyperglycemia in Extremely Preterm Infants,” *Neoreviews*, vol. 21, no. 2, pp. e89–e97, Feb. 2020, doi: 10.1542/neo.21-2-e89.
- [21] G. Alexandrou *et al.*, “Early Hyperglycemia Is a Risk Factor for Death and White Matter Reduction in Preterm Infants,” *Pediatrics*, vol. 125, no. 3, pp. e584–e591, Mar. 2010, doi: 10.1542/peds.2009-0449.
- [22] A. C. Tottman, J. M. Alsweiler, F. H. Bloomfield, M. Pan, and J. E. Harding, “Relationship between Measures of Neonatal Glycemia, Neonatal Illness, and 2-Year Outcomes in Very Preterm Infants,” *J Pediatr*, vol. 188, pp. 115–121, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.jpeds.2017.05.052.
- [23] M. del M. Fernández Martínez *et al.*, “Monitoring the Frequency and Duration of Hypoglycemia in Preterm Infants and Identifying Associated Factors,” *Fetal Pediatr Pathol*, vol. 40, no. 2, pp. 131–141, Mar. 2021, doi: 10.1080/15513815.2019.1692111.
- [24] C. B. Duvanel, C.-L. Fawer, J. Cotting, P. Hohlfeld, and J.-M. Matthieu, “Long-term effects of neonatal hypoglycemia on brain growth and psychomotor development in small-for-gestational-age preterm infants,” *J Pediatr*, vol. 134, no. 4, pp. 492–498, Apr. 1999, doi: 10.1016/S0022-3476(99)70209-X.
- [25] C. Burns, M. Rutherford, J. Boardman, and F. Cowan, “Patterns of cerebral injury and neurodevelopmental outcomes after symptomatic neonatal hypoglycemia,” *Pediatrics*, vol. 122, no. 1, pp. 65–74, Jul. 2008.
- [26] G. Acciaroli, M. Vettoretti, A. Facchinetti, and G. Sparacino, “Calibration of Minimally Invasive Continuous Glucose Monitoring Sensors: State-of-The-Art and Current Perspectives,” *Biosensors (Basel)*, vol. 8, no. 1, p. 24, Mar. 2018, doi: 10.3390/bios8010024.

- [27] G. Cappon, M. Vettoretti, G. Sparacino, and A. Facchinetti, “Continuous Glucose Monitoring Sensors for Diabetes Management: A Review of Technologies and Applications,” *Diabetes Metab J*, vol. 43, no. 4, p. 383, 2019, doi: 10.4093/dmj.2019.0121.
- [28] T. Li, T. Lynn, A. O. Stuart, and K. Beardsall, “Glucose monitoring and management in the NICU – how are we doing?,” *Infant*, vol. 13, no. 5, pp. 182–186, 2017.
- [29] C. J. D. McKinlay, J. G. Chase, J. Dickson, D. L. Harris, J. M. Alsweiler, and J. E. Harding, “Continuous glucose monitoring in neonates: a review,” *Matern Health Neonatol Perinatol*, vol. 3, no. 1, p. 18, Dec. 2017, doi: 10.1186/s40748-017-0055-z.
- [30] K. Beardsall *et al.*, “Prevalence and Determinants of Hyperglycemia in Very Low Birth Weight Infants: Cohort Analyses of the NIRTURE Study,” *J Pediatr*, vol. 157, no. 5, pp. 715-719.e3, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.jpeds.2010.04.032.
- [31] A. Galderisi *et al.*, “Procedural Pain during Insertion of a Continuous Glucose Monitoring Device in Preterm Infants,” *J Pediatr*, vol. 200, pp. 261-264.e1, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.jpeds.2018.03.040.
- [32] K. Beardsall *et al.*, “Real-time continuous glucose monitoring in preterm infants (REACT): an international, open-label, randomised controlled trial,” *Lancet Child Adolesc Health*, vol. 5, no. 4, pp. 265–273, Apr. 2021, doi: 10.1016/S2352-4642(20)30367-9.
- [33] C. K. Boughton and R. Hovorka, “Is an artificial pancreas (closed-loop system) for Type 1 diabetes effective?,” *Diabetic Medicine*, vol. 36, no. 3, pp. 279–286, Mar. 2019, doi: 10.1111/dme.13816.
- [34] N. Allen and A. Gupta, “Current Diabetes Technology: Striving for the Artificial Pancreas,” *Diagnostics*, vol. 9, no. 1, p. 31, Mar. 2019, doi: 10.3390/diagnostics9010031.
- [35] M. Breton *et al.*, “Fully Integrated Artificial Pancreas in Type 1 Diabetes,” *Diabetes*, vol. 61, no. 9, pp. 2230–2237, Sep. 2012, doi: 10.2337/db11-1445.
- [36] A. Galderisi *et al.*, “Continuous Glucose Monitoring in Very Preterm Infants: A Randomized Controlled Trial,” *Pediatrics*, vol. 140, no. 4, Oct. 2017, doi: 10.1542/peds.2017-1162.

- [37] K. Beardsall, “Real time continuous glucose monitoring in neonatal intensive care,” *Early Hum Dev*, vol. 138, p. 104844, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2019.104844.
- [38] M. J. Cipolla, *The Cerebral Circulation*, vol. 5. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2009.
- [39] O. Pryds and A. D. Edwards, “Cerebral blood flow in the newborn infant.,” *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, vol. 74, no. 1, pp. F63–F69, Jan. 1996, doi: 10.1136/fn.74.1.F63.
- [40] D. Hendrikx *et al.*, “Measurement of Neurovascular Coupling in Neonates,” *Front Physiol*, vol. 10, Feb. 2019, doi: 10.3389/fphys.2019.00065.
- [41] M. Kozberg and E. Hillman, “Neurovascular coupling and energy metabolism in the developing brain,” 2016, pp. 213–242. doi: 10.1016/bs.pbr.2016.02.002.
- [42] T. Arichi *et al.*, “Development of BOLD signal hemodynamic responses in the human brain,” *Neuroimage*, vol. 63, no. 2, pp. 663–673, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.06.054.
- [43] C. Mattersberger, G. M. Schmölder, B. Urlsberger, and G. Pichler, “Blood Glucose and Lactate Levels and Cerebral Oxygenation in Preterm and Term Neonates—A Systematic Qualitative Review of the Literature,” *Front Pediatr*, vol. 8, Jul. 2020, doi: 10.3389/fped.2020.00361.
- [44] S. Brigadoi *et al.*, “Mapping hemodynamic changes during hypoglycemia in the very preterm neonatal brain: preliminary results,” in *Diffuse Optical Spectroscopy and Imaging VII*, H. Dehghani and H. Wabnitz, Eds., SPIE, Jul. 2019, p. 13. doi: 10.1117/12.2526974.
- [45] L. Skov and O. Pryds, “Capillary Recruitment for Preservation of Cerebral Glucose Influx in Hypoglycemic, Preterm Newborns: Evidence for a Glucose Sensor?,” *Pediatrics*, vol. 90, no. 2, pp. 193–195, Aug. 1992, doi: 10.1542/peds.90.2.193.
- [46] J. A. Wahr, K. K. Tremper, S. Samra, and D. T. Delpy, “Near-Infrared spectroscopy: Theory and applications,” *J Cardiothorac Vasc Anesth*, vol. 10, no. 3, pp. 406–418, Apr. 1996, doi: 10.1016/S1053-0770(96)80107-8.

- [47] M. Rupawala, H. Dehghani, S. J. E. Lucas, P. Tino, and D. Cruse, “Shining a Light on Awareness: A Review of Functional Near-Infrared Spectroscopy for Prolonged Disorders of Consciousness,” *Front Neurol*, vol. 9, May 2018, doi: 10.3389/fneur.2018.00350.
- [48] A. A. Garvey and E. M. Dempsey, “Applications of near infrared spectroscopy in the neonate,” *Curr Opin Pediatr*, vol. 30, no. 2, pp. 209–215, Apr. 2018, doi: 10.1097/MOP.0000000000000599.
- [49] G. Taga, K. Asakawa, K. Hirasawa, and Y. Konishi, “Hemodynamic responses to visual stimulation in occipital and frontal cortex of newborn infants: a near-infrared optical topography study,” *Early Hum Dev*, vol. 75, pp. 203–210, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2003.08.023.
- [50] D. Haensse *et al.*, “New multichannel near infrared spectrophotometry system for functional studies of the brain in adults and neonates,” *Opt Express*, vol. 13, no. 12, p. 4525, Jun. 2005, doi: 10.1364/OPEX.13.004525.
- [51] M. Shibata *et al.*, “Broad cortical activation in response to tactile stimulation in newborns,” *Neuroreport*, vol. 23, no. 6, pp. 373–377, Apr. 2012, doi: 10.1097/WNR.0b013e3283520296.
- [52] J. Frie, M. Bartocci, H. Lagercrantz, and P. Kuhn, “Cortical Responses to Alien Odors in Newborns: An fNIRS Study,” *Cerebral Cortex*, vol. 28, no. 9, pp. 3229–3240, Sep. 2018, doi: 10.1093/cercor/bhx194.
- [53] C. Peng and X. Hou, “Applications of functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) in neonates,” *Neurosci Res*, vol. 170, pp. 18–23, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.neures.2020.11.003.
- [54] P. Vannasing *et al.*, “Distinct hemispheric specializations for native and non-native languages in one-day-old newborns identified by fNIRS,” *Neuropsychologia*, vol. 84, pp. 63–69, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2016.01.038.
- [55] J. Uchitel *et al.*, “Cot-side imaging of functional connectivity in the developing brain during sleep using wearable high-density diffuse optical tomography,” *Neuroimage*, vol. 265, p. 119784, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.neuroimage.2022.119784.

- [56] A. Pellicer *et al.*, “Cardiovascular Support for Low Birth Weight Infants and Cerebral Hemodynamics: A Randomized, Blinded, Clinical Trial,” *Pediatrics*, vol. 115, no. 6, pp. 1501–1512, Jun. 2005, doi: 10.1542/peds.2004-1396.
- [57] F. Y. Wong, C. P. Barfield, R. S. C. Horne, and A. M. Walker, “Dopamine therapy promotes cerebral flow-metabolism coupling in preterm infants,” *Intensive Care Med*, vol. 35, no. 10, pp. 1777–1782, Oct. 2009, doi: 10.1007/s00134-009-1602-5.
- [58] X. Cui, S. Bray, D. M. Bryant, G. H. Glover, and A. L. Reiss, “A quantitative comparison of NIRS and fMRI across multiple cognitive tasks,” *Neuroimage*, vol. 54, no. 4, pp. 2808–2821, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.10.069.
- [59] A. Galderisi *et al.*, “Long-term continuous monitoring of the preterm brain with diffuse optical tomography and electroencephalography: a technical note on cap manufacturing,” *Neurophotonics*, vol. 3, no. 4, p. 045009, Dec. 2016, doi: 10.1117/1.NPh.3.4.045009.
- [60] S. Brigadoi and R. J. Cooper, “How short is short? Optimum source–detector distance for short-separation channels in functional near-infrared spectroscopy,” *Neurophotonics*, vol. 2, no. 2, p. 025005, May 2015, doi: 10.1117/1.NPh.2.2.025005.
- [61] S. Brigadoi, “Slide del corso di Imaging for Neuroscience, anno accademico 2021-2022.”
- [62] H. Lv *et al.*, “Resting-State Functional MRI: Everything That Nonexperts Have Always Wanted to Know,” *American Journal of Neuroradiology*, Jan. 2018, doi: 10.3174/ajnr.A5527.
- [63] Q. Yu, E. A. Allen, J. Sui, M. R. Arbabshirani, G. Pearlson, and V. D. Calhoun, “Brain Connectivity Networks in Schizophrenia Underlying Resting State Functional Magnetic Resonance Imaging,” *Curr Top Med Chem*, vol. 12, no. 21, pp. 2415–2425, Nov. 2012, doi: 10.2174/156802612805289890.
- [64] D. Batalle *et al.*, “Altered resting-state whole-brain functional networks of neonates with intrauterine growth restriction,” *Cortex*, vol. 77, pp. 119–131, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.cortex.2016.01.012.

- [65] T.-M. Heunis, C. Aldrich, and P. J. de Vries, “Recent Advances in Resting-State Electroencephalography Biomarkers for Autism Spectrum Disorder—A Review of Methodological and Clinical Challenges,” *Pediatr Neurol*, vol. 61, pp. 28–37, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2016.03.010.
- [66] M. D. Rosenberg *et al.*, “A neuromarker of sustained attention from whole-brain functional connectivity,” *Nat Neurosci*, vol. 19, no. 1, pp. 165–171, Jan. 2016, doi: 10.1038/nn.4179.
- [67] S. Brigadoi *et al.*, “The BabyGlucoLight Project: Understanding the Impact of Neonatal Glycemic Control on Brain Hemodynamics and Developmental Outcome in Very Preterm Neonates,” in *Biophotonics Congress: Biomedical Optics 2022 (Translational, Microscopy, OCT, OTS, BRAIN)*, Washington, D.C.: Optica Publishing Group, 2022, p. OTu4D.2. doi: 10.1364/OTS.2022.OTu4D.2.
- [68] N. L. Everdell, A. P. Gibson, I. D. C. Tullis, T. Vaithianathan, J. C. Hebden, and D. T. Delpy, “A frequency multiplexed near-infrared topography system for imaging functional activation in the brain,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 76, no. 9, Sep. 2005, doi: 10.1063/1.2038567.
- [69] H. Dehghani *et al.*, “Near infrared optical tomography using NIRFAST: Algorithm for numerical model and image reconstruction,” *Commun Numer Methods Eng*, vol. 25, no. 6, pp. 711–732, Jun. 2009, doi: 10.1002/cnm.1162.
- [70] S. J. Fonda, D. G. Lewis, and R. A. Vigersky, “Minding the Gaps in Continuous Glucose Monitoring: A Method to Repair Gaps to Achieve More Accurate Glucometrics,” *J Diabetes Sci Technol*, vol. 7, no. 1, pp. 88–92, Jan. 2013, doi: 10.1177/193229681300700110.
- [71] B. C. Whitelaw, P. Choudhary, and D. Hopkins, “Evaluating rate of change as an index of glycemic variability, using continuous glucose monitoring data,” *Diabetes Technol Ther*, vol. 13, no. 6, pp. 631–636, Jun. 2011, doi: 10.1089/dia.2010.0215.
- [72] T. Vigers *et al.*, “Cgmanalysis: An R package for descriptive analysis of continuous glucose monitor data,” *PLoS One*, vol. 14, no. 10, Oct. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0216851.

- [73] S. Brigadoi, P. Aljabar, M. Kuklisova-Murgasova, S. R. Arridge, and R. J. Cooper, “A 4D neonatal head model for diffuse optical imaging of pre-term to term infants,” *Neuroimage*, vol. 100, pp. 385–394, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.06.028.
- [74] S. Brigadoi, D. Salvagnin, M. Fischetti, and R. J. Cooper, “Array Designer: automated optimized array design for functional near-infrared spectroscopy,” *Neurophotonics*, vol. 5, no. 03, p. 1, Sep. 2018, doi: 10.1117/1.NPh.5.3.035010.
- [75] M. Yang *et al.*, “Motion artifact correction for resting-state neonatal functional near-infrared spectroscopy through adaptive estimation of physiological oscillation denoising,” *Neurophotonics*, vol. 9, no. 04, Oct. 2022, doi: 10.1117/1.NPh.9.4.045002.
- [76] T. Acharya and C. Chakrabarti, “A Survey on Lifting-based Discrete Wavelet Transform Architectures,” *J VLSI Signal Process Syst Signal Image Video Technol*, vol. 42, no. 3, pp. 321–339, Mar. 2006, doi: 10.1007/s11266-006-4191-3.
- [77] C. Iester, L. Bonzano, M. Biggio, S. Cutini, M. Bove, and S. Brigadoi, “A comparison of motion correction techniques for resting-state functional connectivity analysis with fNIRS data.,” *Hum Brain Mapp*.
- [78] R. C. Mesquita, M. A. Franceschini, and D. A. Boas, “Resting state functional connectivity of the whole head with near-infrared spectroscopy,” *Biomed Opt Express*, vol. 1, no. 1, p. 324, Aug. 2010, doi: 10.1364/BOE.1.000324.
- [79] G. M. Rojas, C. Alvarez, C. E. Montoya, M. de la Iglesia-Vayá, J. E. Cisternas, and M. Gálvez, “Study of Resting-State Functional Connectivity Networks Using EEG Electrodes Position As Seed,” *Front Neurosci*, vol. 12, Apr. 2018, doi: 10.3389/fnins.2018.00235.
- [80] M. R. Arbabshirani *et al.*, “Impact of autocorrelation on functional connectivity,” *Neuroimage*, vol. 102, pp. 294–308, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.07.045.
- [81] C. F. Bond and K. Richardson, “Seeing the FisherZ-transformation,” *Psychometrika*, vol. 69, no. 2, pp. 291–303, Jun. 2004, doi: 10.1007/BF02295945.
- [82] J. Hauke and T. Kossowski, “Comparison of Values of Pearson’s and Spearman’s Correlation Coefficients on the Same Sets of Data,” *QUAGEO*, vol. 30, no. 2, pp. 87–93, Jun. 2011, doi: 10.2478/v10117-011-0021-1.

- [83] S. Holm, “A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure,” *Scandinavian Journal of Statistics*, vol. 6, pp. 65–70, 1979.
- [84] M. Pastore, M. Nucci, and G. Galfano, “False Discovery Rate: applicazione di un metodo alternativo per i confronti multipli con misure ripetute.,” *Giornale italiano di psicologia, Rivista trimestrale*, pp. 639–652, Mar. 2005.
- [85] M. Xia, J. Wang, and Y. He, “BrainNet Viewer: A Network Visualization Tool for Human Brain Connectomics,” *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e68910, Jul. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0068910.
- [86] I. de Roever, G. Bale, S. Mitra, J. Meek, N. J. Robertson, and I. Tachtsidis, “Investigation of the Pattern of the Hemodynamic Response as Measured by Functional Near-Infrared Spectroscopy (fNIRS) Studies in Newborns, Less Than a Month Old: A Systematic Review,” *Front Hum Neurosci*, vol. 12, Oct. 2018, doi: 10.3389/fnhum.2018.00371.
- [87] Y. Fuchino *et al.*, “Effects of Preterm Birth on Intrinsic Fluctuations in Neonatal Cerebral Activity Examined Using Optical Imaging,” *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e67432, Jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0067432.
- [88] B. Blanco, M. Molnar, and C. Caballero-Gaudes, “Effect of prewhitening in resting-state functional near-infrared spectroscopy data,” *Neurophotonics*, vol. 5, no. 04, p. 1, Oct. 2018, doi: 10.1117/1.NPh.5.4.040401.
- [89] H. Zhao *et al.*, “Design and validation of a mechanically flexible and ultra-lightweight high-density diffuse optical tomography system for functional neuroimaging of newborns,” *Neurophotonics*, vol. 8, no. 01, Mar. 2021, doi: 10.1117/1.NPh.8.1.015011.
- [90] V. de Rond, M. Gilat, N. D’Cruz, F. Hulzinga, J.-J. Orban de Xivry, and A. Nieuwboer, “Test-retest reliability of functional near-infrared spectroscopy during a finger-tapping and postural task in healthy older adults,” *Neurophotonics*, vol. 10, no. 02, May 2023, doi: 10.1117/1.NPh.10.2.025010.
- [91] M. Scolari, K. N. Seidl-Rathkopf, and S. Kastner, “Functions of the human frontoparietal attention network: Evidence from neuroimaging,” *Curr Opin Behav Sci*, vol. 1, pp. 32–39, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.cobeha.2014.08.003.

APPENDICE

Di seguito verranno riportate le immagini contenenti le matrici di connettività funzionale cerebrale a riposo calcolate per ogni paziente, per ogni cromoforo e per ogni finestra temporale analizzata.

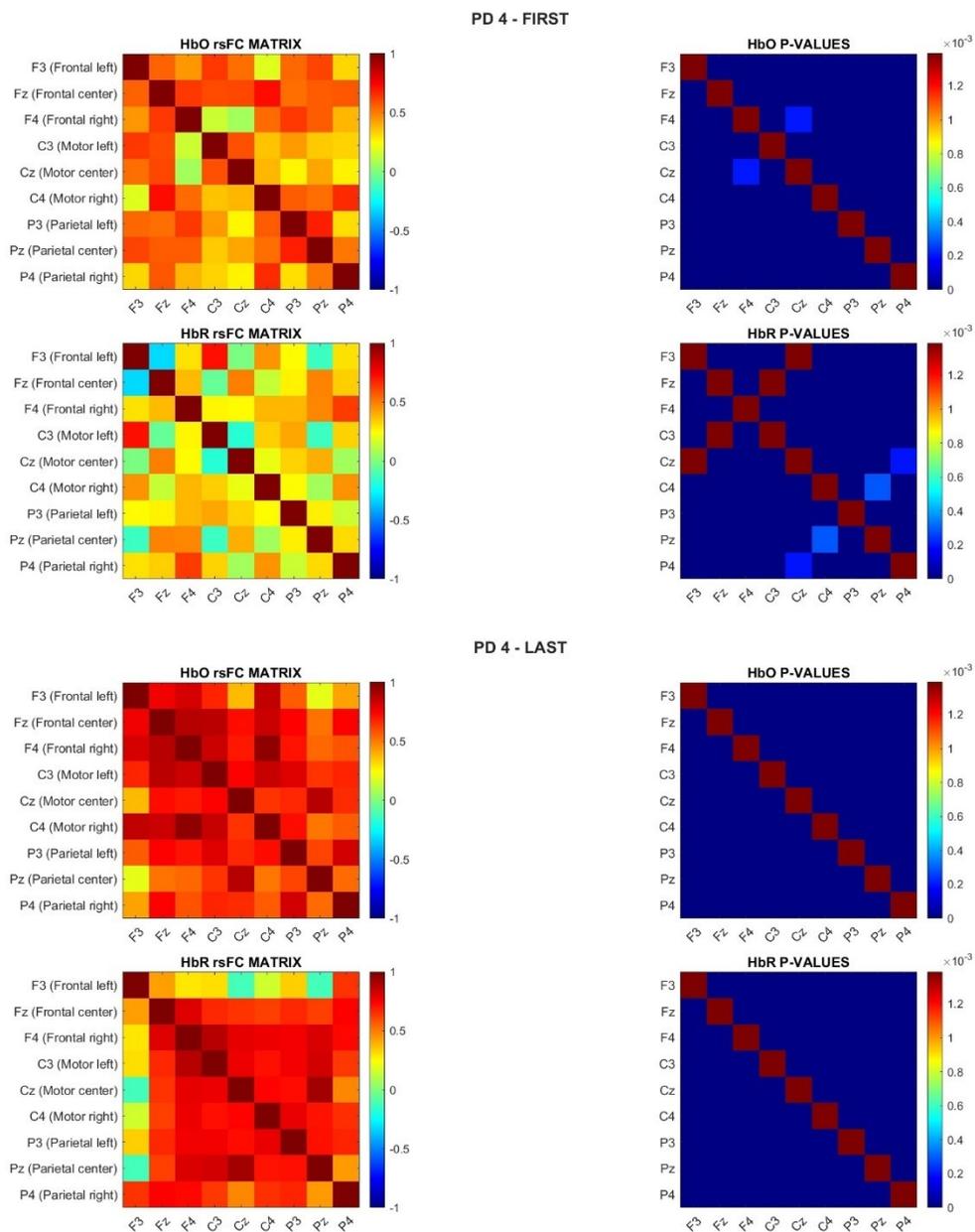


Fig. A1. Matrici di resting state functional connectivity riferite al paziente numero 4 nelle due finestre migliori rilevate nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia per HbO e HbR. In riferimento alla matrice dei p-value, ottenuta tramite correzione di Bonferroni per 36 confronti ($\alpha_{bonf} = 0.0014$), i riquadri in rosso corrispondono alle correlazioni non statisticamente significative.

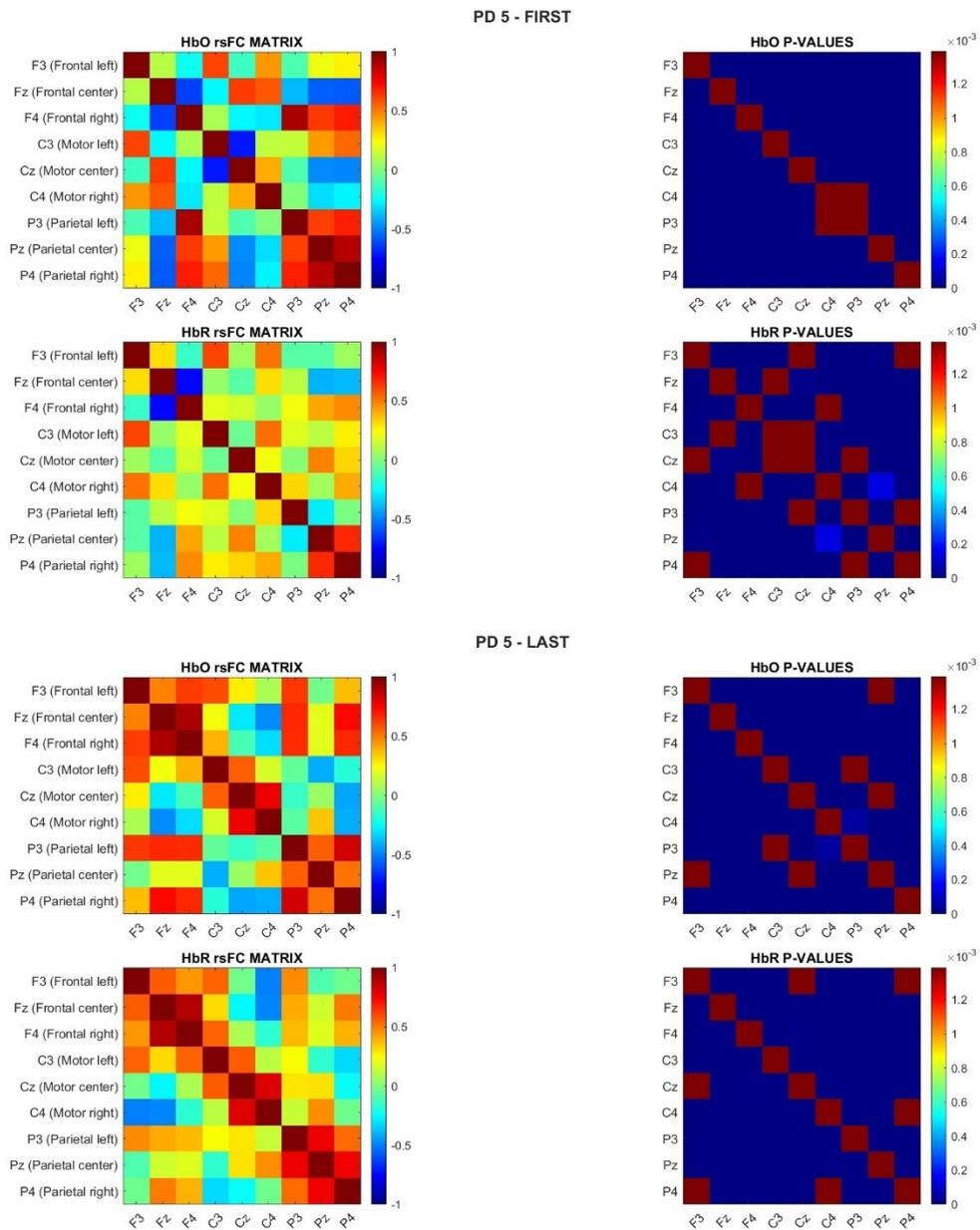


Fig. A2. Matrici di resting state functional connectivity riferite al paziente numero 5 nelle due finestre migliori rilevate nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia per HbO e HbR. In riferimento alla matrice dei p-value, ottenuta tramite correzione di Bonferroni per 36 confronti ($\alpha_{\text{bonf}} = 0.0014$), i riquadri in rosso corrispondono alle correlazioni non statisticamente significative.

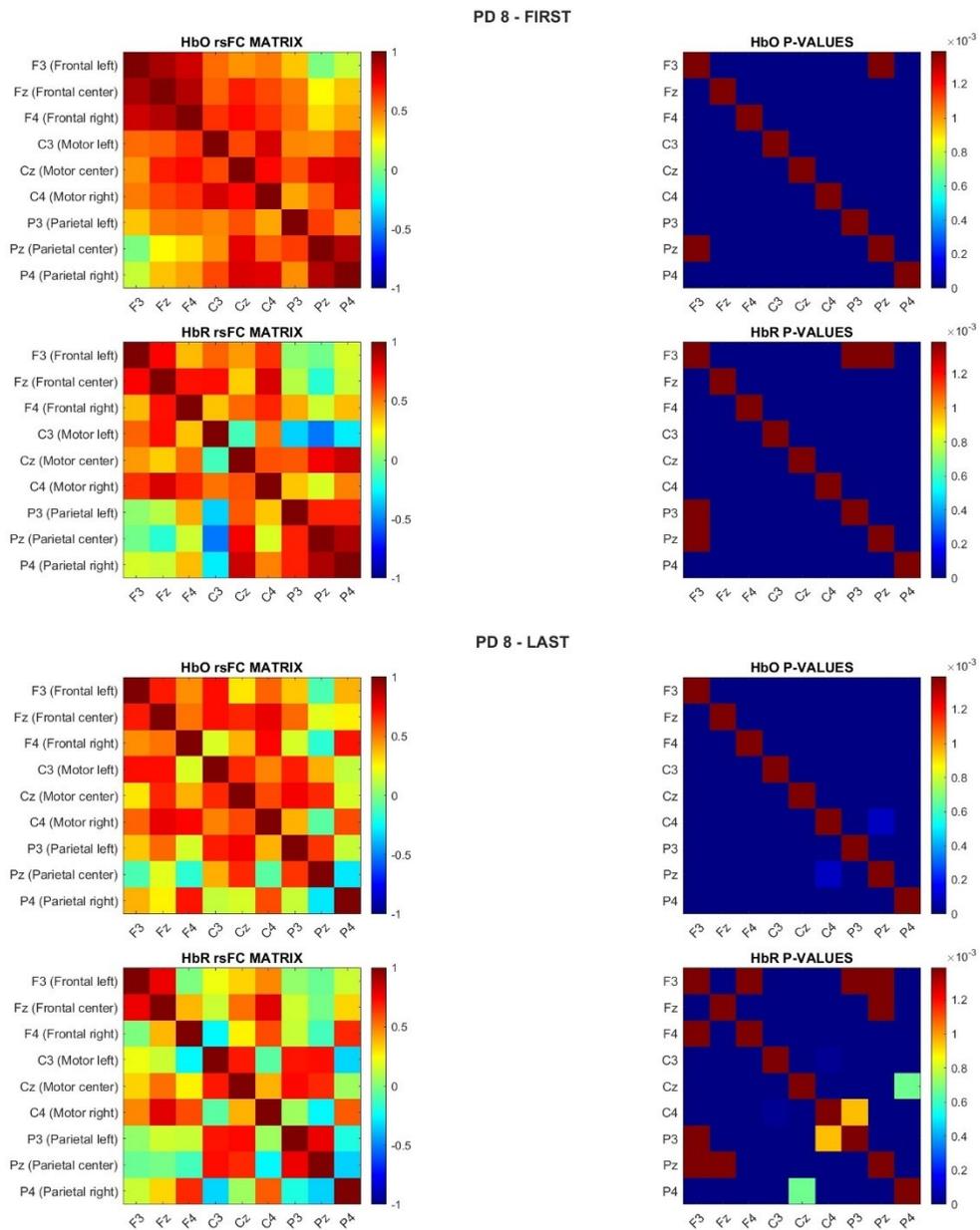


Fig. A3. Matrici di resting state functional connectivity riferite al paziente numero 8 nelle due finestre migliori rilevate nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia per HbO e HbR. In riferimento alla matrice dei p-value, ottenuta tramite correzione di Bonferroni per 36 confronti ($\alpha_{\text{bonf}} = 0.0014$), i riquadri in rosso corrispondono alle correlazioni non statisticamente significative.

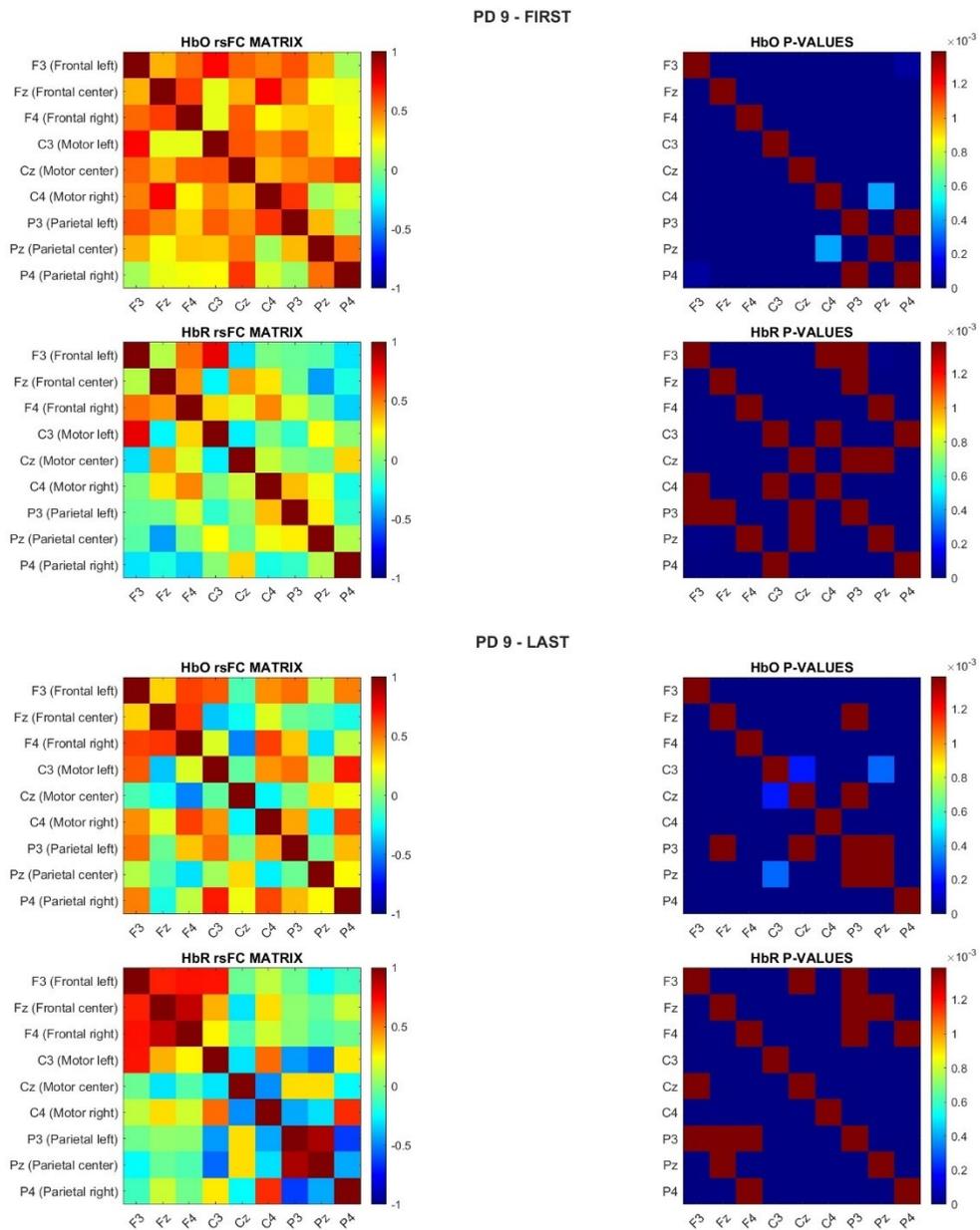


Fig. A4. Matrici di resting state functional connectivity riferite al paziente numero 9 nelle due finestre migliori rilevate nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia per HbO e HbR. In riferimento alla matrice dei p-value, ottenuta tramite correzione di Bonferroni per 36 confronti ($\alpha_{\text{bonf}} = 0.0014$), i riquadri in rosso corrispondono alle correlazioni non statisticamente significative.

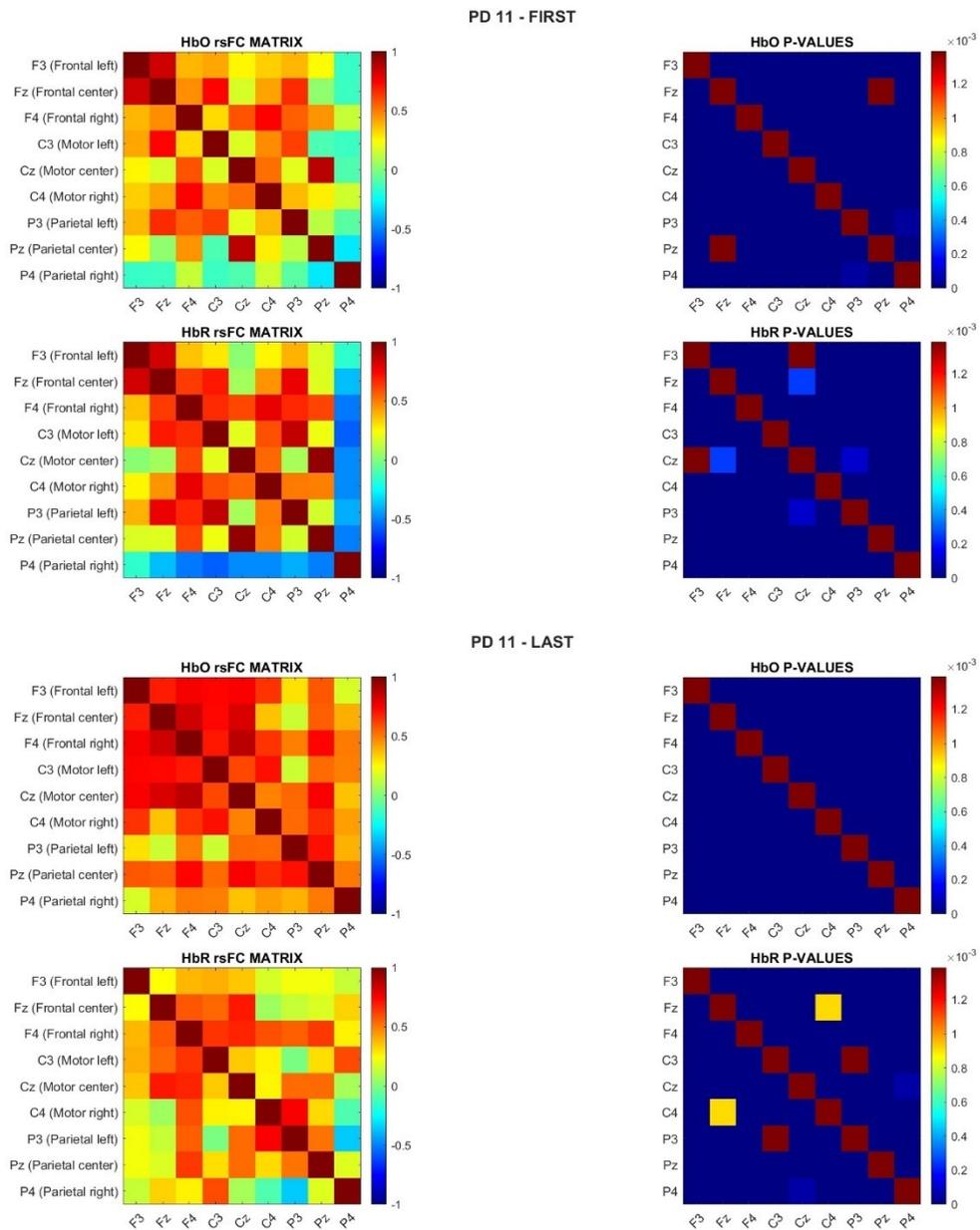


Fig. A5. Matrici di resting state functional connectivity riferite al paziente numero 11 nelle due finestre migliori rilevate nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia per HbO e HbR. In riferimento alla matrice dei p-value, ottenuta tramite correzione di Bonferroni per 36 confronti ($\alpha_{\text{bonf}} = 0.0014$), i riquadri in rosso corrispondono alle correlazioni non statisticamente significative.

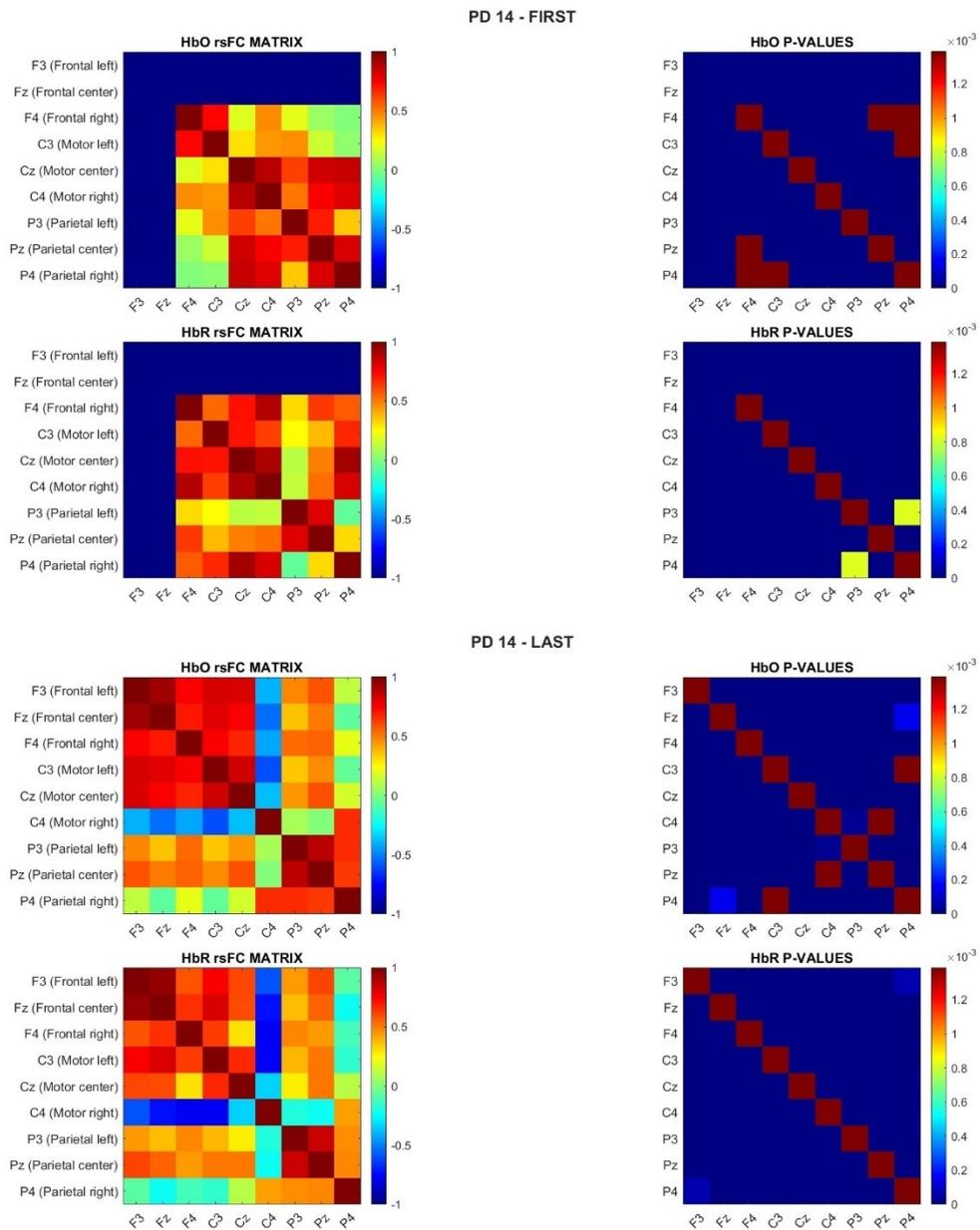


Fig. A6. Matrici di resting state functional connectivity riferite al paziente numero 14 nelle due finestre migliori rilevate nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia per HbO e HbR. In riferimento alla matrice dei p-value, ottenuta tramite correzione di Bonferroni per 36 confronti ($\alpha_{\text{bonf}} = 0.0014$), i riquadri in rosso corrispondono alle correlazioni non statisticamente significative.

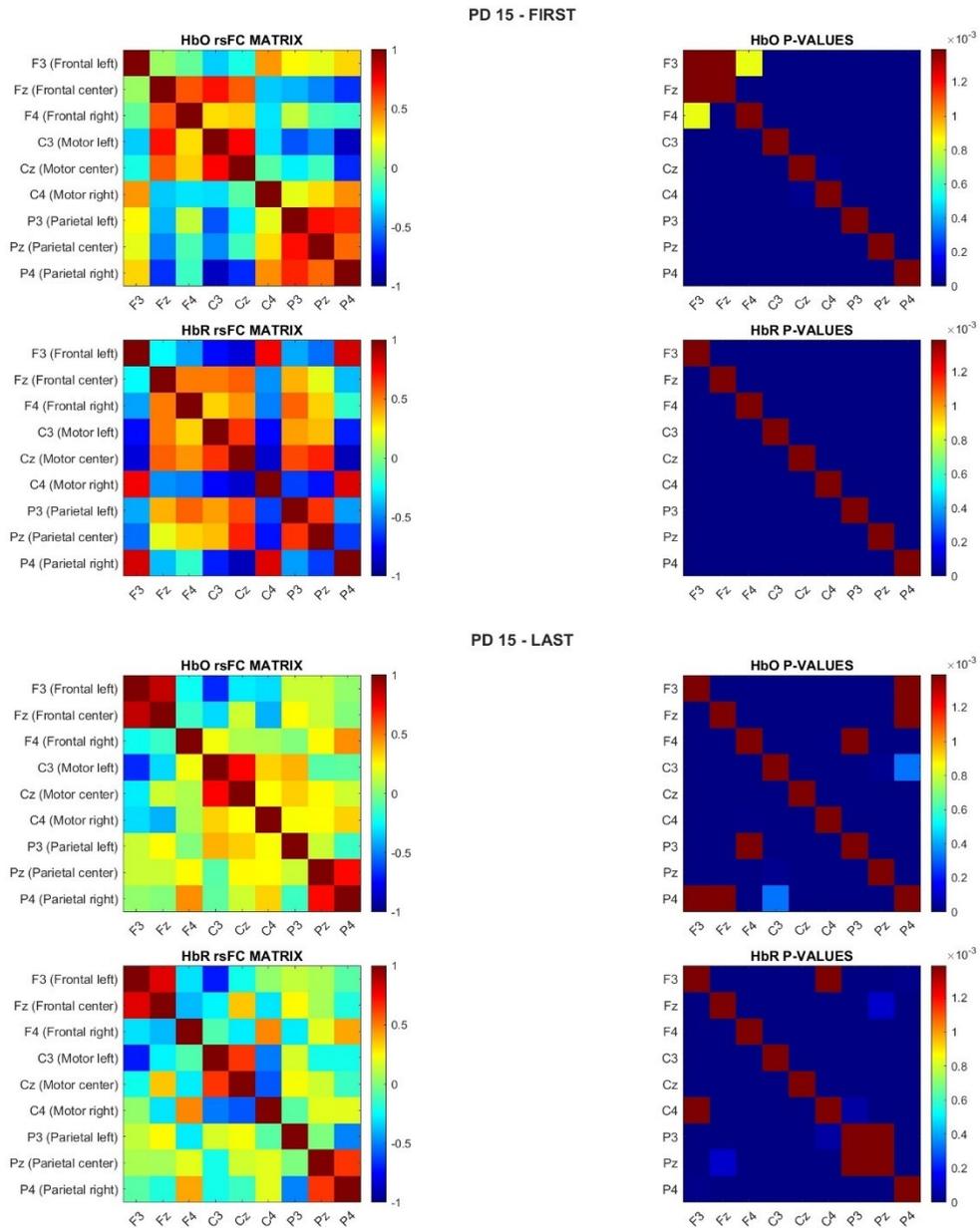


Fig. A7. Matrici di resting state functional connectivity riferite al paziente numero 15 nelle due finestre migliori rilevate nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia per HbO e HbR. In riferimento alla matrice dei p-value, ottenuta tramite correzione di Bonferroni per 36 confronti ($\alpha_{\text{bonf}} = 0.0014$), i riquadri in rosso corrispondono alle correlazioni non statisticamente significative.

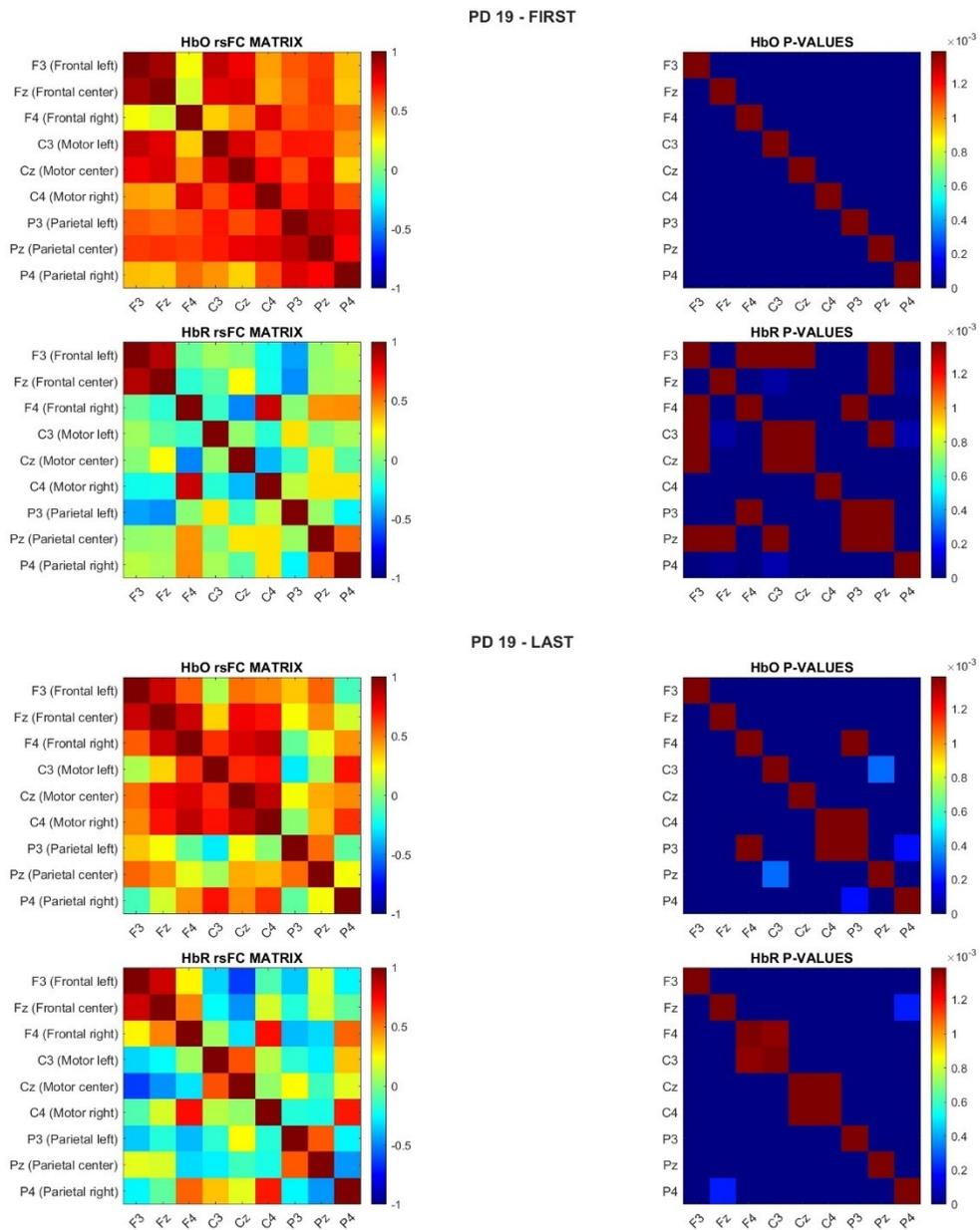


Fig. A8. Matrici di resting state functional connectivity riferite al paziente numero 19 nelle due finestre migliori rilevate nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia per HbO e HbR. In riferimento alla matrice dei p-value, ottenuta tramite correzione di Bonferroni per 36 confronti ($\alpha_{\text{bonf}} = 0.0014$), i riquadri in rosso corrispondono alle correlazioni non statisticamente significative.

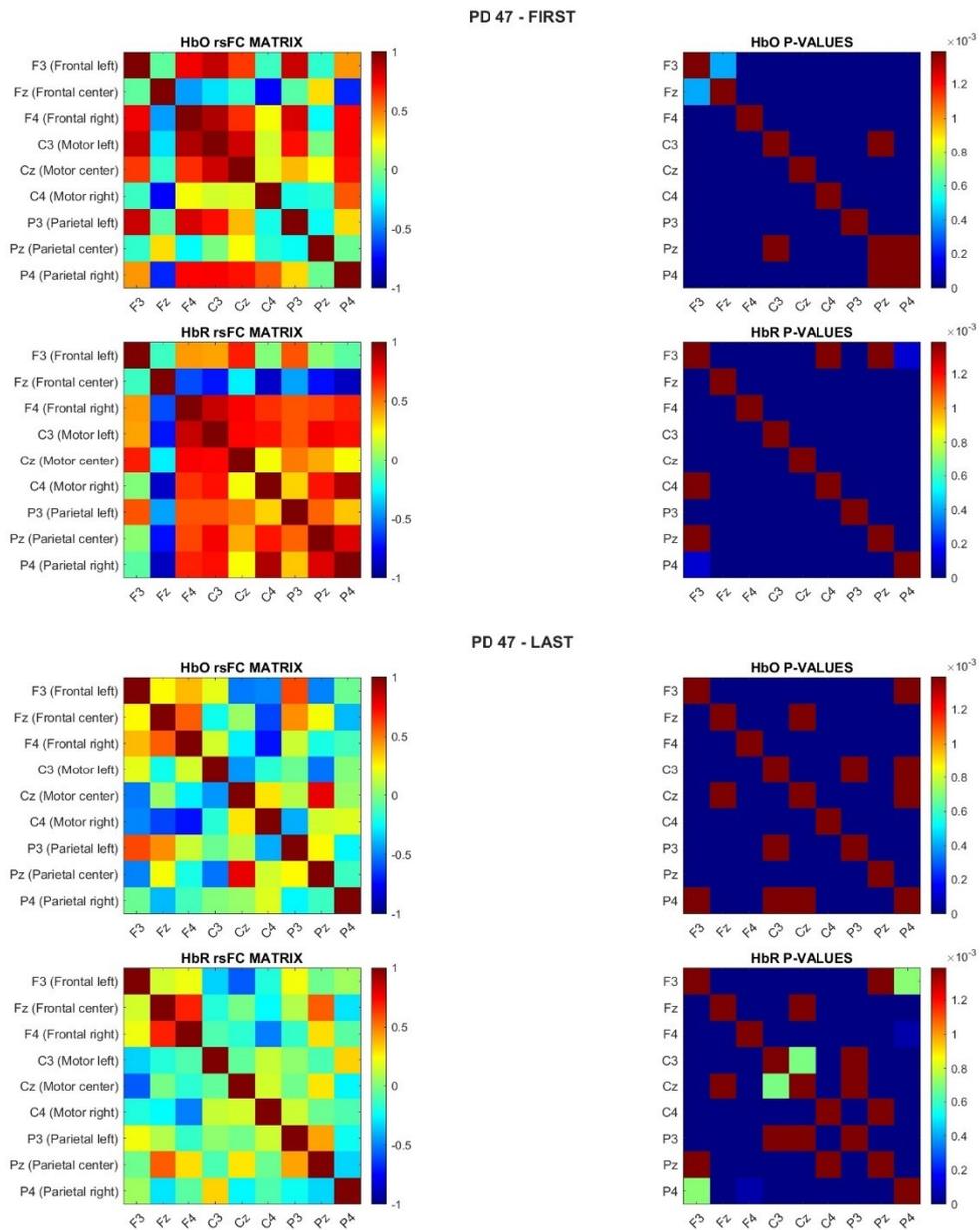


Fig. A9. Matrici di resting state functional connectivity riferite al paziente numero 47 nelle due finestre migliori rilevate nel primo ed ultimo intervallo di euglicemia per HbO e HbR. In riferimento alla matrice dei p-value, ottenuta tramite correzione di Bonferroni per 36 confronti ($\alpha_{\text{bonf}} = 0.0014$), i riquadri in rosso corrispondono alle correlazioni non statisticamente significative.