

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI

Ciclo XXXII°

Settore Concorsuale: 06/G1

Settore Scientifico disciplinare: MED/38

**VALUTAZIONE PRECOCE DELLA FUNZIONALITA' VISIVA
NEI NEONATI PRETERMINE VERY LOW BIRTH WEIGHT**

Analisi dei fattori nutrizionali coinvolti nello sviluppo della funzionalità visiva

Presentata da **Dott.ssa Anna Giulia Cimatti**

Coordinatore Dottorato

Prof. Fabio Piscaglia

Relatore

Prof. Luigi Tommaso Corvaglia

Esame finale anno 2020

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Funzione visiva neonatale.....	3
1.2 Fattori nutrizionali (acidi grassi polinsaturi a lunga catena LC-PUFA).....	5
2. PROGETTO DI RICERCA.....	6
2.1 Obiettivi dello studio.....	6
2.2 Materiale e Metodi.....	7
2.2.1. Prima fase.....	7
2.2.2. Seconda fase.....	12
2.3 Risultati.....	23
- prima fase.....	23
- seconda fase.....	28
- funzionalità visiva.....	32
2.4 Discussione.....	47
- prima fase.....	47
- seconda fase.....	49
- funzionalità visiva.....	51
3. ABBREVIAZIONI.....	53
4. BIBLIOGRAFIA.....	54

1. INTRODUZIONE

1.1. FUNZIONE VISIVA NEONATALE

L'interesse per lo sviluppo della percezione visiva in epoca infantile è sensibilmente incrementato negli ultimi anni. Lo sviluppo del tessuto cerebrale e delle strutture deputate alla visione inizia già durante la vita intrauterina, ma prosegue attivamente anche dopo il parto e nei primi anni di vita, con particolare riferimento alla sinaptogenesi ed all'organizzazione della sostanza bianca⁽¹⁾. Pertanto le informazioni che il bambino ottiene fin dalle prime settimane di vita, utilizzando i canali neurosensoriali, influiscono attivamente sul suo sviluppo psicomotorio condizionando le competenze cognitive e relazionali che progressivamente il bambino svilupperà⁽¹⁾.

Il funzionamento corretto del sistema visivo prevede l'integrità di un complesso apparato costituito dalla sinergia tra diverse aree corticali e sottocorticali ciascuna con un ruolo specifico nel processamento delle informazioni visive. Già negli anni '70 *Bronson et al*⁽¹⁹⁾ suggerivano che in epoca neonatale le risposte agli stimoli visivi fossero controllate da strutture sottocorticali mentre le vie visive corticali associative, localizzate a livello occipitale e coinvolte nel processare l'immagine e ottenere informazioni complesse, maturassero progressivamente nelle prime 6-8 settimane dalla nascita. Queste ultime si dividono in una via ventrale, deputata al controllo percettivo dell'immagine, individuando quindi 'cosa' o 'chi' stiamo guardando, mentre la via dorsale controlla le azioni, determinando 'dove' si trova l'oggetto o la persona percepita e di conseguenza organizza il movimento per raggiungerla.

Grazie all'utilizzo combinato di tecniche di neuroimaging ed elettrofisiologiche è stato possibile definire meglio il profilo di sviluppo delle funzioni visive.

Difficilmente tali indagini però possono essere effettuate precocemente, sia per la scarsa attendibilità dell'esame, se eseguito troppo presto, oppure perché le condizioni cliniche del paziente ne controindicano l'esecuzione.

Recentemente, invece, è stata sviluppata, validata e applicata una batteria di

valutazione di semplice esecuzione che permette di ottenere informazioni sulla funzionalità visiva già in epoca neonatale precoce sia in neonati a termine che in neonati pretermine a partire dalle 31 settimane di età post concezionale (EG), ricoverati in terapia intensiva neonatale⁽²⁾. Tale batteria prende in esame diversi aspetti tra cui la capacità di fissare e seguire un oggetto, i movimenti oculari, la percezione di un contrasto colorato, la discriminazione di strisce bianche e nere a frequenza spaziale crescente e l'attenzione a distanza⁽³⁾. L'esame si è dimostrato di facile esecuzione e, se eseguito nelle modalità corrette, il 90 % dei neonati è in grado di portare a termine la valutazione⁽³⁾. Tale testistica ha dimostrato inoltre che nei neonati pretermine, raggiunta l'epoca presunta del parto, gli aspetti della funzionalità visiva sono direttamente correlati alla maturazione della sostanza bianca e delle vie ottiche⁽⁴⁾. Alcune competenze, infatti, si sviluppano molto precocemente mentre altre risentono fortemente dell'esperienza extra-uterina⁽¹⁹⁾. Lo studio condotto da *Romeo et al.*⁽²³⁾ supporta tale tesi: gli autori hanno valutato la funzionalità visiva, mediante la batteria di test, mettendo a confronto due gruppi di neonati (a termine e late-preterm, ovvero con età gestazionale 34-36 settimane); il gruppo di late-preterm è stato valutato alla nascita e al raggiungimento delle 40 settimane, mentre il gruppo a termine a 48 e 72 ore di vita. Comparando i risultati tra i due gruppi è emerso che per gli item di inseguimento orizzontale e di inseguimento di un cerchio il gruppo di late-preterm a 40 settimane otteneva risultati migliori rispetto ai neonati a termine a 48 h di vita. Ciò a conferma del fatto che tali competenze risentono dell'esperienza extrauterina ovvero degli stimoli a cui il neonato è stato sottoposto nelle prime settimane di vita, di pertinenza sottocorticale.

E' noto che in neonati prematuri abbiano un rischio elevato di sviluppare deficit neuroevolutivi, motori e deficit della funzione visiva rispetto ai neonati a termine⁽⁵⁾. Il deficit visivo può risultare in seguito ad un danno corticale a livello della via ottica o nelle aree limitrofi, oppure in seguito ad una grave retinopatia della prematurità^(6,7).

Bassi et al.⁽⁴⁾ hanno dimostrato la stretta relazione tra la risposta alla valutazione

visiva e il livello di mielinizzazione delle radiazioni ottiche e la maturazione della sostanza bianca. Il riconoscimento precoce di deficit visivi permetterebbe di modulare in maniera specifica il percorso riabilitativo dei pazienti al fine di ottenere un outcome evolutivo migliore.

1.2. FATTORI NUTRIZIONALI (ACIDI GRASSI POLINSATURI A LUNGA CATENA (LC-PUFA))

Dai dati della letteratura è noto inoltre come alcuni acidi grassi polinsaturi a lunga catena (LC-PUFA) svolgano un ruolo chiave nello sviluppo neurosensoriale durante i primi mesi di vita, poiché sono coinvolti nella composizione strutturale delle membrane retiniche e neuronali stesse ^(8,9). Gli LC-PUFA sono rappresentati dall'acido arachidonico (AA, 20:4n-6) e dagli acidi eicosapentanoico (EPA, 20:5n-6) e docosaesaenoico (DHA, 22:6n-3), che derivano rispettivamente dall'acido linoleico (LA, 18:2n-6) e dall'acido alfa-linolenico (ALA, 18:3n-3). Le prime evidenze inerenti gli effetti benefici degli LC-PUFA, ed in modo particolare del DHA sull'acuità visiva, risalgono agli anni '90, quando si osservò una significativa correlazione tra concentrazione eritrocitaria di DHA, maggiori punteggi di sviluppo psicomotorio ^(10,11) e migliori outcome di acuità visiva in neonati a termine ⁽¹²⁾ e pretermine ⁽¹³⁾ alimentati al seno o con formule supplementate con LC-PUFA.

In epoca neonatale, tuttavia, la disponibilità di LC-PUFA all'interno dell'organismo dipende largamente dagli apporti esogeni, poiché i sistemi enzimatici dei neonati, soprattutto se pretermine, non sono in grado di sintetizzare quantitativi di LC-PUFA adeguati per un ottimale sviluppo del sistema nervoso; in particolare, la sintesi endogena di DHA, che presenta i maggiori effetti benefici sullo sviluppo del tessuto nervoso, risulta essere maggiormente inficiata nei primi mesi di vita rispetto alla sintesi di AA ⁽¹²⁾.

Gli LC-PUFA sono fisiologicamente contenuti nel latte materno, tuttavia la loro concentrazione viene significativamente influenzata dagli apporti dietetici materni ⁽¹⁴⁾.

Durante la gravidanza il passaggio transplacentare di DHA e AA avviene

prevalentemente nel terzo trimestre ⁽²⁵⁾ pertanto, in caso di parto pretermine, i valori di LC-PUFA possono risultare scarsi nel neonato e di conseguenza strettamente correlati all'intake dietetico materno. Bassi valori ematici di DHA, in tale delicata popolazione, si associano inoltre ad un maggiore rischio di complicazioni legate alla prematurità, specialmente di carattere neurologico ⁽²⁶⁾.

Il latte materno è l'alimento ottimale, sia per i neonati a termine che pretermine, in considerazione degli estremi benefici di tipo nutrizionale e non ^(27,28). E' stato osservato in letteratura che la supplementazione con acido docosaesaenoico (DHA) sotto forma di olio di pesce durante l'allattamento è in grado di incrementare il contenuto di LC-PUFA nel latte materno ⁽¹⁵⁾. I bambini allattati al seno dalle madri riceventi la supplementazione con olio di pesce hanno inoltre mostrato maggiori concentrazioni plasmatiche di omega 3 ⁽¹⁵⁾.

L'*Antartic Krill*, conosciuto anche come *Euphausia superba*, è un crostaceo particolarmente ricco di acidi grassi a lunga catena omega-3, quali EPA e DHA. Mentre gli LC-PUFA sono contenuti nell'olio di pesce in forma di trigliceridi, gli LC-PUFA dell'olio di Krill sono legati alla fosfatidilcolina, che ne migliora la biodisponibilità⁽¹⁶⁾. Ad oggi, tuttavia, non è noto se la supplementazione della dieta materna con olio di Krill sia in grado di incrementare la concentrazione di LC-PUFA nel latte materno e di conseguenza negli eritrociti del neonato che lo assume.

2. PROGETTO DI RICERCA

2.1 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Gli obiettivi del nostro studio sono:

1) Endpoint primario:

- Valutare se la supplementazione materna combinata con olio di pesce ed olio di Krill durante l'allattamento sia in grado di incrementare il contenuto in LC-

PUFA (EPA, DHA, LA, ALA, AA, rapporto AA:DHA) nel latte materno di madri di neonati a termine e pretermine

2) Endpoint secondario:

- Valutare se l'assunzione di latte materno, previa supplementazione con olio di Krill nella dieta della nutrice, migliori lo sviluppo della funzionalità visiva nel neonato pretermine very low birth weight (VLBW).

2.2 MATERIALI E METODI

Il progetto si articola in due fasi integrate tra loro:

2.2.1. PRIMA FASE

E' stato condotto uno studio interventistico, prospettico, monocentrico e randomizzato in aperto tra Novembre 2016 e Giugno 2018 presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna (A.O.U.), Policlinico Sant'Orsola-Malpighi.

Criteria di inclusione:

- Madri di neonati nati a termine ed allattati al seno, donatrici della Banca del Latte Umano Donato (BLUD) di Bologna;

oppure:

- Madri di neonati prematuri (età gestazionale <36 settimane) ricoverati presso la Terapia Intensiva Neonatale dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Sant'Orsola-Malpighi di Bologna ed alimentati con latte materno;
- Consenso informato scritto;
- Età maggiore di 18 anni.

Criteri di esclusione:

- Terapie farmacologiche che costituiscono una controindicazione all'allattamento al seno;
- Patologie materne che costituiscono una controindicazione all'allattamento al seno.

Disegno dello studio:

Le donne, arruolate consecutivamente tra le 4 e le 6 settimane post-partum, sono state assegnate mediante randomizzazione in aperto ad uno dei seguenti gruppi:

- Gruppo 1: supplementazione quotidiana con olio di Krill ed olio di pesce mediante assunzione giornaliera di 2 capsule di un integratore a base di olio di Krill e di pesce, che garantiscono un apporto giornaliero di DHA pari a 250 mg e 70 mg di EPA, 20 µg di Vitamina D, 15 mg di Vitamina E e 2400 µg di vitamina A per una durata complessiva di 30 giorni consecutivi.
- Gruppo 2: gruppo non supplementato.

All'inizio dell'arruolamento, alle donne arruolate, è stato inoltre somministrato un questionario nutrizionale basato sulle abitudini alimentari (food frequency questionnaire, FFQ) (Fig. 1) specificamente validato per la valutazione quantitativa degli apporti dietetici di LC-PUFA e dei loro precursori, al fine di quantificare gli apporti di LC-PUFA con la dieta. La valutazione di tale questionario è stata effettuata da un collaboratore specificamente edotto e cieco sia all'assegnazione del trattamento ai soggetti arruolati sia ai risultati dell'analisi relativa alla composizione in LC-PUFA del latte materno. E' stata inoltre valutata la compliance del gruppo 1 dopo circa 15 giorni di supplementazione mediante visita o telefonata.

QUESTIONARIO SULL'INTAKE DI ACIDI GRASSI POLINSATURI (PUFA)

Mettere una crocetta in base alla frequenza di consumo nell'ultimo mese per ognuna delle porzioni degli alimenti segnati sulla colonna di sinistra

- se il consumo dell'alimento è più di 3 volte a settimana, segnare a penna il numero di porzioni consumate abitualmente nella settimana nella colonna di sinistra ">3 volte/sett" (es. 2 cucchiari di olio d'oliva al giorno corrispondono a 14 porzioni alla settimana)

	>3 volte/sett	3 volte/sett	2 volte/sett	1 volte/sett	<1 volte/sett	MAI
Noci (1 porzione 20 g – 3 noci)						
Altra frutta secca (1 porzione 20 g)						
Pesce azzurro (sardine, salmone, tonno fresco, alici, sgombro, aringhe) (1 porzione 150 g)						
Tonno sott'olio sgocciolato (1 porz. 1 scatoletta da 52g)						
Altro tipo di pesce (1 porzione 150 g)						
Crostacei e molluschi (1 porzione 150 g)						
Olio di semi (1 porzione 1 cucchiaino)						
Olio di oliva (1 porzione 1 cucchiaino)						
Lardo, maionese (1 porzione 1 cucchiaino)						
Alimenti ricchi in olio di palma (merendine, biscotti frollini, patatine in busta) (1 porzione 30 g – 3 biscotti)						
Uova intere (1 porzione 1 uovo)						
Pasta, pane e riso (1 porzione 100 g)						
Cereali (avena, mais, orzo, frumento, grano saraceno) (1 porzione 50 g)						
Formaggi (1 porzione 40 g)						
Vitello-Manzo (1 porzione 120 g)						
Maiale (1 porzione 120 g)						
Carne bianca (1 porzione 120 g)						
Salumi (1 porzione 40 g)						
Dolci farciti (1 porzione 100 g)						
Integratori di omega 3 (1 porzione 1 capsula)						

Fig. 1 Questionario FFQ (Food Frequency Questionnaire)

Esami di Laboratorio

Lo studio ha previsto l'analisi qualitativa delle quote percentuali degli LC-PUFA contenuti nel latte materno (DHA, AA, EPA rapporto AA:DHA), effettuata mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-SM). Nelle nutrici assegnate al gruppo 1 è stato raccolto un campione di latte (20 ml) prima dell'inizio della supplementazione (T0) e al termine della supplementazione, dopo 30 giorni

(T1). Nel gruppo di controllo sono stati svolti i medesimi campionamenti secondo le medesime tempistiche, al fine di valutare eventuali differenze nella composizione qualitativa in LC-PUFA in relazione alla supplementazione combinata con olio di Krill e di pesce.

I campioni di latte sono stati estratti dalle madri arruolate mediante tiralatte elettrico secondo le tempistiche illustrate, durante la mattina, e sono stati conservati in appositi contenitori di plastica secondo le normali procedure di raccolta e conservazione del latte previste nel protocollo HACCP della BLUD (-80C°). I campioni sono stati quindi ritirati da personale addetto e consegnati sia presso il Centro di Ricerca Biomedica Applicata (C.R.B.A.) dell'A.O.U. Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna, sia presso l' Unità di Chimica Analitica Bio-Agroalimentare (CABA-Lab) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna dove è stata effettuata l'analisi qualitativa delle quote percentuali degli LC-PUFA contenuti nel latte materno (DHA, AA, EPA rapporto AA:DHA)

Metodo in gascromatografia-spettrometria di massa per l'analisi degli acidi grassi nel latte materno

Per l'analisi percentile degli acidi grassi dei campioni di latte materno è stata usata la gascromatografia con detector ad ionizzazione di fiamma (GC-FID). La separazione cromatografica è stata eseguita con il gas-cromatografo Agilent 7890 B, equipaggiato con una colonna Varian CP-Sil 88 (100 m x 0,2 µm x 0,25 mm).

Gli acidi grassi del latte materno vengono estratti e transesterificati seguendo le procedure descritte dalla due norme ISO 14156:2001 Milk and milk products - Extraction methods for lipids and liposolubile compounds e ISO 15884:2002 Milk fat – Preparation of fatty acid methyl esters rispettivamente.

Gli acidi grassi estratti e trasformati mediante transesterificazione nei rispettivi esteri metilici, più termostabili e volatili, vengono quindi sottoposti alla separazione gascromatografica. L'identificazione dei singoli acidi grassi avviene mediante il

confronto con differenti miscele standard di acidi grassi.

Comitato Etico

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna. Le nutrici arruolate, regolarmente informate, hanno provveduto alla firma del consenso.

Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata condotta con SPSS Statistics versione 25.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, III, US). Per confrontare i valori mediani % di DHA, EPA, AA, LC-PUFA e il rapporto AA:DHA tra T0 e T1 nel latte delle nutrici supplementate e nel latte dei controlli è stato usato il Wilcoxon signed-rank test. Per confrontare il rapporto AA:DHA a T0 e T1, la variazione percentuale di tale rapporto ($\Delta\%$ T1-T0) fra i due gruppi e per confrontare le caratteristiche cliniche e i valori dell'intake dietetico di LCPUFA è stato usato il Mann-Whitney *U*-test. Infine, per valutare l'effetto della supplementazione sulla variazione di DHA, EPA ed AA al netto di altri possibili fattori influenti, quali apporti dietetici o la concentrazione di DHA, EPA ed AA al baseline, è stato costruito un modello di regressione lineare, considerando il $\Delta\%$ T1-T0 dei suddetti LC-PUFA come variabile dipendente e gli intakes nutrizionali, ricavati dal questionario alimentare, le rispettive concentrazioni nel latte a T0 e lo stato di supplementazione, come variabili indipendenti. Per confrontare la prevalenza degli intake nutrizionali indagati di DHA+EPA tra i due gruppi è stato utilizzato Fisher's exact test.

Per ciascun test effettuato si sono considerati livelli di significatività $p < 0,05$.

2.2.2 SECONDA FASE

Nel corso della seconda fase è stato condotto uno studio interventistico, prospettico, monocentrico e randomizzato controllato in cieco singolo nel periodo compreso tra Luglio 2018 e Settembre 2019 presso la Terapia Intensiva Neonatale (TIN) dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi

Criteria di inclusione:

- Neonati pretermine VLBW (età gestazionale ≤ 32 settimane e/o PN ≤ 1500 gr) ricoverati presso la Terapia Intensiva Neonatale dell'A.O.U. Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna ed alimentati con latte materno o donato;
- Consenso informato firmato dai genitori/tutori legali;

Criteria di esclusione:

- Terapie farmacologiche della nutrice che costituiscono una controindicazione all'allattamento al seno;
- Patologie materne che costituiscono una controindicazione all'allattamento al seno;
- Malformazioni congenite, cromosomiche, disordini metabolici del neonato;
- Infezioni congenite neonatali;
- Crisi convulsive, emorragia intraventricolare di III-IV grado, leucomalacia periventricolare del neonato;
- Retinopatia del prematuro stadio >2 .

Disegno dello studio

I neonati arruolati sono stati assegnati mediante randomizzazione in cieco singolo ad uno dei seguenti gruppi:

- Gruppo 1: ricevente latte materno o donato proveniente da nutrice supplementata con olio di Krill ed olio di pesce mediante assunzione giornaliera di 2 capsule di

un integratore a base di olio di Krill e di olio di pesce, che garantisce un apporto giornaliero di DHA pari a 250 mg e 70 mg di EPA, 20 µg di Vitamina D, 15 mg di Vitamina E e 2400 µg di vitamina A durante tutto il ricovero presso la TIN-Neonatologia.

- Gruppo 2: ricevente latte materno o donato proveniente da nutrice non supplementata con olio di Krill.

Per garantire il bilanciamento tra neonati che ricevevano latte materno supplementato e non supplementato è stata preparata una liste random.

L'arruolamento è proseguito per tutta la durata del ricovero in TIN-Neonatologia.

Dopo aver effettuato la randomizzazione alle nutrici è stato inoltre somministrato il questionario nutrizionale basato sulle abitudini alimentari (food frequency questionnaire, FFQ – fig 1).

Test di Funzionalità visiva Neonatale

A 33 settimane di EG e ogni 2 settimane fino a 40 settimane di EC sono stati eseguiti i test di funzionalità visiva presso la TIN utilizzando la batteria di valutazione validata da Ricci *et al.* ⁽¹⁹⁾

Il protocollo della batteria di valutazione della funzionalità visiva prevede 9 item (figura 2 e 3) volti ad indagare:

- la presenza e la frequenza di movimenti oculari anomali spontanei;
- la presenza di movimenti oculari in risposta ad un target;
- la presenza di fissazione stabile, instabile o assente.
- l'inseguimento per un arco orizzontale, con risposta completa, incompleta, breve o assente;
- l'inseguimento verticale con risposta completa, incompleta, breve o assente;
- l'inseguimento orizzontale con risposta completa, incompleta, breve o assente;
- la reazione allo stimolo colorato;
- la discriminazione di strisce in bianco e nero a frequenza spaziale crescente (da

0,32 a 3,2 cicli/grado) presentate come 8 diversi stimoli;

- l'attenzione a distanza.

	ITEM	TARGET		Occasional strabismus	Occasional/Intermittent strabismus	Intermittent strabismus	Continuous strabismus
1	Spontaneous ocular motility Note spontaneous ocular movements before presenting a target		Mainly conjugated	R L	R L	R L	R L
2	Ocular movements with a target: note ocular movements while presenting the target		Mainly conjugated	R L	R L	R L	R L
3	Fixation: with the target in front of the infant at 25 cm, note the ability of the infant to fix on the target		Stable (> 5 sec)	Unstable (< 5 sec)		Absent	
Tracking – black/white target							
	Tracking: Note the infant's eye movement in response to the target movements.						
4	Horizontal: With the target at 25 cm and starting in the midline move it slowly to both left and right		Complete R L	Incomplete R L	R	Brief L	Absent
5	Vertical: With the target at 25 cm, and starting in the midline move it slowly upwards and downwards		Complete U D	Incomplete U D	U	Brief D	Absent
6	Arc: With the target at 25 cm, move it slowly tracing an arc		Complete R L	Incomplete R L	R	Brief L	Absent
Colour / discrimination / attention							
7	Tracking coloured stimulus: Note the infant's eye movement in response to the target movements, starting from the midline towards lateral		Present	Absent			
8	Stripe discrimination Note the infant's ability to fixate on a series of targets of decreasing stripe width held at a distance of 30 cm starting with the widest stripe, note the maximal stripe width on which the infant fixates.		Last card identified				
9	Attention at distance After eliciting central fixation move the target slowly away and a few cm laterally from the infant and note the maximal distance at which focusing is maintained		On.....				

Fig 2. Valutazione della funzionalità visiva in età neonatale



Fig 3. Rappresentazione del materiale per la testistica della valutazione della funzione visiva neonatale

Il neonato è stato valutato durante i pasti in uno stato comportamentale 4 o 5 (veglia quieta o veglia attiva) secondo Prechtl sollevato di 30°. L'ambiente in cui il paziente è stato valutato doveva essere il più tranquillo possibile, privo di rumori e con luci soffuse in modo da favorire l'apertura degli occhi del paziente. L'esaminatore ha cercato di non interagire durante l'esame e mantenersi al di fuori del campo visivo del neonato. La valutazione è stata effettuata da un unico sperimentatore specificamente edotto e cieco sia all'assegnazione del trattamento dei soggetti arruolati, sia dei risultati dell'analisi relativa alla composizione in LC-PUFA del latte materno.

Per la valutazione della funzionalità visiva a 6 mesi di EC è stato utilizzato un protocollo di valutazione specifico, sempre validato dal gruppo di *Ricci et al.* (Figura 4). Le batterie visive a 3 e 6 mesi di EC sono state eseguite presso l'Ambulatorio Specialistico del nostro Policlinico.

MODALITA' DI ESECUZIONE	TARGET	SCORING
<p>Setting</p> <ul style="list-style-type: none"> - ambiente - postura* - target 		<input type="checkbox"/> normo illuminato <input type="checkbox"/> semioscuro <input type="checkbox"/> oscuro <input type="checkbox"/> in braccio al genitore <input type="checkbox"/> semiseduto <input type="checkbox"/> supino <input type="checkbox"/> target colorato <input type="checkbox"/> target B/N <input type="checkbox"/> target illuminato <input type="checkbox"/> mira luminosa
<p>Fissazione: porre il target ad una distanza di circa 30-40cm, in posizione mediana di sguardo e attirare l'attenzione del bambino. Ripetere l'operazione nelle diverse posizioni di sguardo a capo bloccato.</p>		<input type="checkbox"/> presente <input type="checkbox"/> assente <input type="checkbox"/> stabile (> 3 sec) <input type="checkbox"/> instabile (< 3 sec) <input type="checkbox"/> posiz. primaria <input type="checkbox"/> laterovers. destra <input type="checkbox"/> laterovers. sinistra <input type="checkbox"/> sguardo in alto <input type="checkbox"/> sguardo in basso
<p>Distanza massima di fissazione: attirare l'attenzione del bambino sul target e spostarlo, lungo la posizione mediana di sguardo, allontanandolo (fino ad almeno 3 metri). Notare a che distanza il bambino perde l'attenzione per lo stimolo. Ripetere per 3 volte e segnare la distanza media. Se il bambino porta lenti correttive eseguire la prova con gli occhiali.</p>		_____ cm
<p>Inseguimento: porre il target ad una distanza di circa 30-40cm e, dalla posizione mediana di sguardo, spostarlo lentamente in orizzontale, in verticale e in cerchio. Verificare se il bambino riesce a seguire lo stimolo, segnare fino a che punto lo segue e la qualità dell'inseguimento.</p>		orizzontale <input type="checkbox"/> completo <input type="checkbox"/> incompleto <input type="checkbox"/> breve <input type="checkbox"/> assente verticale <input type="checkbox"/> completo <input type="checkbox"/> incompleto <input type="checkbox"/> breve <input type="checkbox"/> assente cerchio <input type="checkbox"/> completo <input type="checkbox"/> incompleto <input type="checkbox"/> breve <input type="checkbox"/> assente <input type="checkbox"/> continuo <input type="checkbox"/> discontinuo <input type="checkbox"/> fluido <input type="checkbox"/> non fluido <input type="checkbox"/> con il capo
<p>Movimenti saccadici sono movimenti rapidi e coniugati degli occhi e la loro funzione è quella di spostare la fissazione da un obiettivo ad un altro. Mantenendo un target per mano, mostrarne uno all'altezza della spalla dell'esaminatore e, ottenuta la fissazione, abbassare il target proposto e contemporaneamente proporre l'altro. Ripetere il tutto almeno 2 volte per lato anche in verticale, mantenendo la stessa distanza tra i target. Osservare se il bambino esegue un movimento rapido di ricerca del target.</p>		Orizzontali <input type="checkbox"/> completi <input type="checkbox"/> assenti Verticali <input type="checkbox"/> completi <input type="checkbox"/> assenti con aiuto del capo <input type="checkbox"/>
<p>Fixation Manuale: valuta l'attenzione visiva considerando la capacità del bambino di spostare lo sguardo da un target centrale ad uno periferico. Si utilizzano due bersagli, uno dei due viene posto di fronte al bambino ed utilizzato come target di fissazione; il secondo viene fatto comparire lateralmente. La prova può avvenire "con e senza competizione".</p> <p>-prova "non competitiva": quando il target centrale scompare simultaneamente alla comparsa del target periferico</p> <p>-prova "competitiva": quando il target centrale rimane visibile quando compare quello periferico. Le prove vanno ripetute almeno 3 volte in modo random. Dopo ogni prova nascondere i target.</p>		Spostamento dello sguardo: Non competizione visiva <input type="checkbox"/> presente <input type="checkbox"/> assente Competizione visiva <input type="checkbox"/> presente <input type="checkbox"/> assente

Il paziente arruolato verrà regolarmente rivalutato nei primi due anni di vita nel corso del follow-up del nato pretermine che prevede la valutazione dello sviluppo psicomotorio mediante scale di sviluppo standardizzate (Scale di Sviluppo Mentale Griffiths - GMDS-R, Griffiths, 1996) associate alla valutazione della funzione visiva in relazione dell'età a 3, 6, 9 e 12 e 24 mesi di EC.

Le Scale Griffiths sono costituite da 276 item suddivisi in cinque sottoscale che indagano i principali aspetti dello sviluppo motorio, personale-sociale, uditivo-linguistico, di coordinazione oculo-motoria e di performance cognitiva. Le cinque sottoscale sono costruite basandosi sull'idea di un'organizzazione gerarchica delle competenze esaminate (Griffiths, 1996). Gli item di ciascuna sottoscala sono ordinati in una sequenza di difficoltà crescente basata sull'ipotesi di una progressiva maturazione delle abilità (Griffiths, 1996). La Sottoscala Locomotoria (A, 54 item) esamina lo sviluppo del controllo posturale, della motricità globale e della deambulazione. Per i primi mesi di vita essa si basa sull'osservazione del comportamento spontaneo del bambino, mentre successivamente prevede la presentazione di compiti motori di difficoltà crescente. La Sottoscala Personale-Sociale (B, 58 item) indaga la capacità del bambino di adattarsi, lo sviluppo delle competenze sociali e dell'autonomia personale. Essa si basa anche su informazioni fornite dal genitore circa il comportamento del bambino nell'ambiente familiare e nella vita di tutti i giorni. La Sottoscala Uditivo-Linguistica (C, 56 item) esamina le capacità di discriminazione uditiva e il primo sviluppo comunicativo e linguistico in comprensione e produzione. La Sottoscala Oculo-Motoria (D, 54 item) indaga la capacità di inseguire, raggiungere e afferrare gli oggetti e lo sviluppo della motricità fine. Infine la Sottoscala Performance (E, 54item) indaga lo sviluppo delle funzioni cognitive di programmare e compiere azioni volontarie finalizzate ad uno scopo e di rappresentarsi mentalmente gli oggetti.

Come per tutti i test psicometrici, esistono alcuni criteri generali di somministrazione (Griffiths,1996):

- ambiente idoneo e tranquillo;

- livello di attenzione e vigilanza del bambino;
- presenza di almeno uno dei due genitori.

L'ordine di somministrazione non è rigido e l'esaminatore è libero, sulla base della propria esperienza e dello stato di collaborazione del bambino, di scegliere da quale situazione-stimolo partire per la valutazione.

La suddivisione in sottoscale permette di comprendere se il bambino ha difficoltà in ambiti specifici dello sviluppo e, per ciascun ambito, quali item non riesce a superare. Come per altri test psicometrici, si considerano deficitari i quozienti di sviluppo inferiori alle due deviazioni standard (ds), in area limite i punteggi tra -1 e -2 ds e nella norma quelli superiori a -1 ds. La Tabella 1 riassume il valore clinico del quoziente ottenuto per la scala globale (QG) (Griffiths, 1996).

Sviluppo	ds	QG
Normale	≥ -1	≥ 88.7
Ritardo Lieve	-1 a -2	76.9 - 88.6
Ritardo Moderato	-2 a -3	65.1 - 76.8
Ritardo Severo	< -3	≤ 65

Tab1. Valori clinici del quoziente di sviluppo psicomotorio globale alle Scale Griffith.

Esami di laboratorio

E' stata effettuata l'analisi qualitativa della composizione percentuale in LC-PUFA (EPA, DHA, LA, ALA, AA, rapporto AA:DHA) a livello delle membrane eritrocitarie nei due gruppi di neonati pretermine arruolati, entro 1 settimana dalla nascita (T0), a 33 (T1) e 40 (T2) settimane di EC, al fine di valutare eventuali differenze nella composizione qualitativa in LC-PUFA in relazione alla supplementazione con olio di Krill e di pesce.

Sono stati analizzati inoltre i campioni di latte, nella quantità di 20 ml, contestualmente assunto a T0, T1 e T2, estratti dalle madri arruolate mediante

tiralatte elettrico, durante la mattina. Tali campioni sono stati conservati in appositi contenitori di plastica secondo le normali procedure di raccolta e conservazione del latte previste nel protocollo HACCP della BLUD (-80C°).

I campioni ematici e di latte sono stati quindi ritirati da personale addetto e cieco sull'assegnazione del trattamento dei soggetti arruolati e consegnati sia presso il Centro di Ricerca Biomedica Applicata (C.R.B.A.) dell'A.O.U. Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna e sia presso l'Unità di Chimica Analitica Bio-Agroalimentare (CABA-Lab) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna per l'analisi qualitativa della composizione in LC-PUFA.

Metodo in gascromatografia-spettrometria di massa per l'analisi degli acidi grassi nel latte materno e su globuli rossi

Per l'analisi su latte materno è stata eseguita la medesima metodica utilizzata nella fase 1. Per l'analisi percentile degli eritrociti dei neonati prematuri è stata sempre usata la gascromatografia con detector ad ionizzazione di fiamma (GC-FID). La separazione cromatografica è stata eseguita con il gas-cromatografo Agilent 7890 B, equipaggiato con una colonna Varian CP-Sil 88 (100 m x 0,2 µm x 0,25 mm).

Per quanto riguarda la determinazione degli acidi grassi degli eritrociti, a causa dell'esiguità del campione, è stata utilizzata una metodica diversa che prevede la derivatizzazione diretta degli acidi grassi nel campione ottenuto dalla centrifugazione di sangue intero dopo l'eliminazione del plasma.

Gli acidi grassi estratti e trasformati mediante transesterificazione nei rispettivi esteri metilici, più termostabili e volatili, vengono quindi sottoposti alla separazione gascromatografica. L'identificazione dei singoli acidi grassi avviene mediante il confronto con differenti miscele standard di acidi grassi.

Materiali

Standards:

Standards acidi grassi "Supelco 37 Component FAME Mix"

Standard interno Methyl tridecanoate (C13).

Preparazione delle soluzioni standard:

Standard acidi grassi: diluire 10 μ L di soluzione con 5 μ L di diclorometano.

Standard interno: preparare soluzione a 0,1 mg/50 μ L in esano.

Preparazione delle altre soluzioni:

Soluzione Sodio metossido: viene sciolto 108 mg in 1 mL di metanolo

Soluzione BHT: si scioglie 1 mg in 10 μ L di metanolo

Tampone PBS: si scioglie una pastiglia in 100 mL di acqua distillata

Estrazione e derivatizzazione del campione:

Si addiziona al campione di plasma 3 mL di tampone PBS e che viene agitato per 30 secondi. La miscela viene centrifugata a 7000 rpm a 4°C per 20 minuti.

Dopo aver eliminato lo strato acquoso (superiore) si aggiungono 10 μ L di soluzione BHT, 80 μ L di standard interno di C13:0, 500 μ L di metanolo e 500 μ L di soluzione di sodio metossido. La soluzione viene posta in agitazione magnetica per 10 minuti al buio. Successivamente vengono aggiunti 2 mL di esano, si agita per 30 secondi e si centrifuga per 5 minuti a 2000 rpm a 20°C. Il surnatante (esano) viene trasferito in una vial da 2 mL e concentrato sotto flusso di azoto fino a 500 μ L. A questo punto vengono poi iniettati i globuli rossi nella soluzione.

Comitato Etico

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna. I genitori dei pazienti arruolati, regolarmente informati, hanno provveduto alla firma del consenso.

Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata condotta con SPSS Statistics versione 25.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, III, US). In base ai risultati ottenuti dalla testistica a 33,35,37,40 settimane di EC e in corso del follow-up del nato pretermine a 3 e 6 mesi di EC, è stata eseguita un'analisi del *Chi-quadro* per le

variabili ordinali (motilità oculare spontanea, motilità oculare al target, inseguimento del target orizzontale, verticale ad arco, fissazione, punteggio di fissazione totale, punteggio totale agli inseguimenti, inseguimento dello stimolo colorato, movimenti saccadici orizzontali e verticali, fissazione competitiva e non competitiva, posizione del capo e dello sguardo e posizione preferenziale dello sguardo).

Per variabili di scala continua (acuità visiva, campo visivo, stereopsi, sensibilità al contrasto e Scale di Sviluppo Mentale Griffiths - GMDS-R, Griffiths, 1996) è stato utilizzato il *t-test* per campioni indipendenti.

Per verificare le relazioni tra le competenze valutate mediante la batteria visiva e le caratteristiche biologiche alla nascita (EG e IUGR) sono state condotte le seguenti analisi di correlazione:

- motilità oculare spontanea a 33, 35, 37, 40 settimane e a 3 e 6 mesi di EC;
- motilità oculare al target a 33, 35, 37, 40 settimane e a 3 mesi di EC;
- fissazione a 33, 35, 37, 40 settimane a 3 e 6 mesi di EC;
- punteggio di fissazione totale a 33, 35, 37, 40 settimane e a 3 e a 6 mesi di EC;
- inseguimento al target orizzontale, verticale ed arco a 33, 35, 37,40 settimane e a 3 e 6 mesi di EC;
- punteggio totale agli inseguimenti a 33, 35, 37, 40 settimane e a 3 e 6 mesi di EC;
- inseguimento allo stimolo colorato a 33, 35, 37, 40 settimane e a 3 mesi di EC;
- acuità visiva a 33, 35, 37, 40 settimane e a 3 e 6 mesi di EC;
- attenzione a distanza a 33, 35, 37, 40 settimane e a 3 e 6 mesi di EC;
- punteggio di distanza totale a 33, 35, 37, 40 settimane e a 3 e 6 mesi di EC;
- stato comportamentale a 33, 35, 37,40 settimane e a 3 mesi di EC;
- fissazione, direzione di fissazione e distanza di fissazione a 6 mesi di EC;
- movimenti saccadici orizzontali e verticali a 6 mesi di EC;
- fissazione manuale competitiva e non competitiva a 6 mesi di EC
- campo visivo destro e sinistro a 6 mesi di EC
- stereopsi a 6 mesi di EC
- sensibilità al contrasto a 6 mesi di EC

- posizione dello sguardo a 6 mesi di EC

Tutte le correlazioni sopra indicate sono state calcolate con il coefficiente di correlazione di Pearson.

Per ciascun test effettuato si sono considerati livelli di significatività $p < 0,05$.

2.3. RISULTATI

Prima Fase

La popolazione dello studio della *prima fase* è costituita da 20 soggetti: 10 madri di neonati a termine e 10 madri di neonati pretermine alimentati con latte materno esclusivo. Sono disponibili i dati completi con valori a T0 e a T1 di 16 nutrici su 20, a causa dell'impossibilità ad effettuare il secondo campionamento in quattro delle mamme di neonati arruolate per mancanza di latte (figura 5). Su questi dati è stata svolta l'analisi statistica.

Le caratteristiche cliniche dei neonati sono riassunte nella tabella 2. Non si sono evidenziate differenze statisticamente significative nell'età post concezionale dei neonati tra i due gruppi al momento della raccolta dei campioni ($p = 0.798$).

Delle 16 mamme arruolate, 8 hanno ricevuto la supplementazione (gruppo 1) e 8 sono state assegnate al gruppo di controllo (gruppo 2).

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i due gruppi nei valori di LC-PUFA assunti attraverso la dieta e stimati mediante l'FFQ all'inizio dell'arruolamento (Tabella 3). I dati ottenuti dal FFQ inoltre hanno evidenziato bassi valori di DHA, rispetto a quelli raccomandati dalle linee guida italiane⁽²⁴⁾, in 5 donne nel gruppo 1 e in 3 donne nel gruppo 2 ($p = 0.399$). In seguito alla supplementazione con DHA ed EPA le 5 donne del gruppo 1 hanno raggiunto valori nutrizionali adeguati.

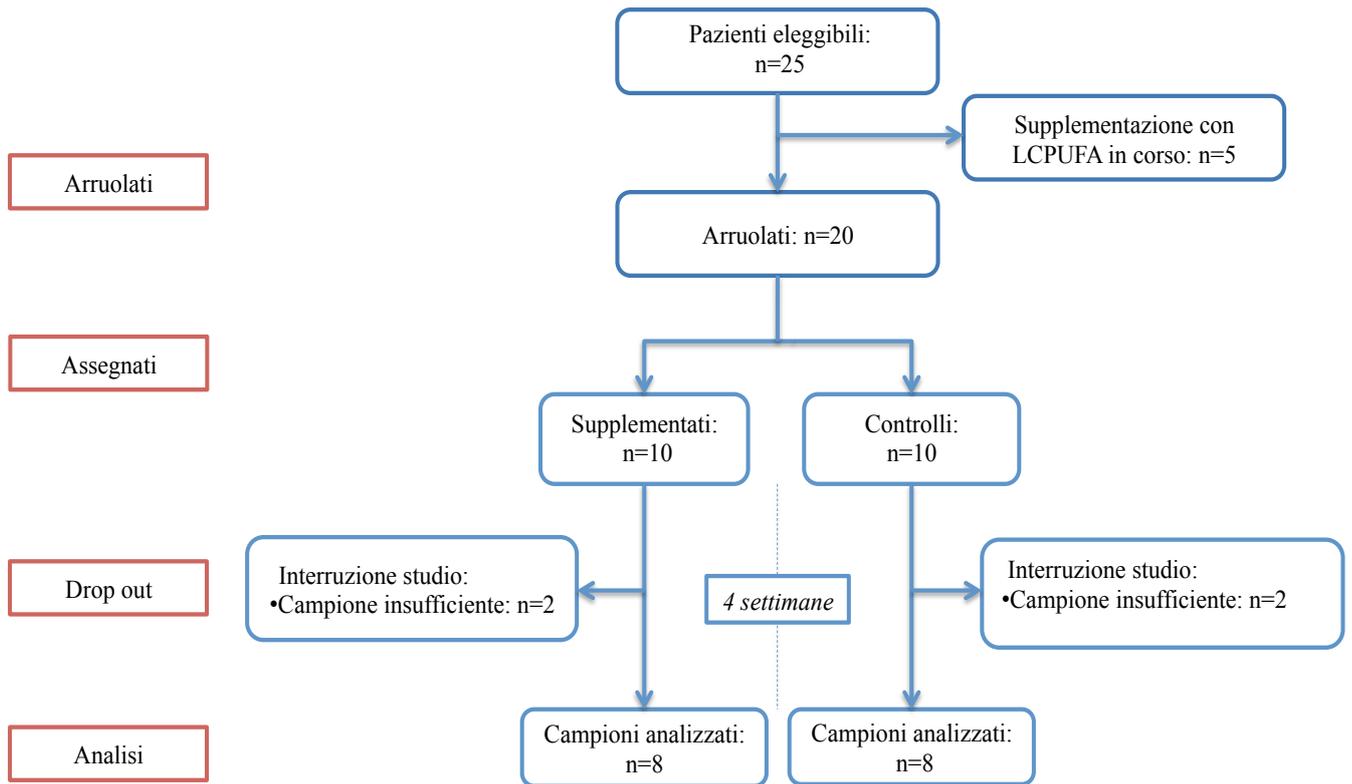


Fig 5. Flow chart delle varie fasi di arruolamento

Caratteristiche neonati	Gruppo 1 (n=8)	Gruppo 2 (n=8)	Gruppo 1 vs. 2, p-value
Età gestazionale alla nascita (settimane), mediana (IQR)	35.3 (30.6-39.7)	34.8 (31.5-39.8)	.798 ^o
Età post-concezionale a T0 (settimane), mediana (IQR)	40.3 (36.6-43.7)	39.7 (37.3-43.8)	.798 ^o
N. di neonati pretermine (EG ≤32 settimane), n (%)	4 (50%)	4 (50%)	1 [§]

Tab. 2 Caratteristiche cliniche dei neonati nei due gruppi e risultati ottenuti dal confronto dei due gruppi
^oMann-Whitney U test, [§]Fisher's exact test

Intakes con la dieta, mediana interquartile [IQR]) (range	Gruppo 1 (n=8)	Gruppo 2 (n=8)	Gruppo 1 vs. 2, p-value
AL, g/sett	33.70 (24.82 – 48.25)	36.41 (32.20 – 44.41)	.606
ALA, g/sett	3.15 (2.64 – 4.65)	3.39 (2.92 – 4.31)	.797
AA, g/sett	0.94 (0.53 – 1.24)	1.04 (0.72 – 2.41)	.298
EPA, g/sett	0.77 (0.65 – 1.55)	0.76 (0.50 – 2.28)	.898
DHA, g/sett	1.42 (1.03 – 2.65)	1.12 (0.67 – 3.95)	1.000
ω -6, g/sett	34.78 (25.79 – 49.24)	37.30 (32.99 – 46.83)	.606
ω -3, g/sett	5.67 (4.64 – 8.12)	5.53 (4.12 – 10.39)	1.000

Tab. 3. Intake settimanale di acido linoleico (AL), acido alfa-linolenico (ALA), acido arachidonico (AA), acido eicosapentaenoico (EPA), acido docosaesaenoico (DHA), ω -6 and ω -3 nei due gruppi, ottenuti attraverso il food-frequency questionnaire (FFQ).

Nella tabella 4 sono riportate le mediane dei valori a T0 e a T1 del contenuto percentuale di DHA, EPA, AA nei due gruppi. Non si sono evidenziate differenze significative per valori %DHA, %AA, ed %EPA al baseline tra i due gruppi.

Nel gruppo 1 si è osservato un aumento significativo dei valori %DHA ed %EPA (rispettivamente $p=0.012$ e $p=0.037$) e una riduzione significativa dei valori %AA ($p=0.017$) a T1 rispetto a T0. Nel gruppo 2 si è osservata una riduzione dei valori %DHA, %AA, ed %EPA a T1 rispetto a T0, con valori significativi solo per %AA ($p=0.036$) (Figura 6 e 7).

Valori mediani % (interquartile range [IQR])	Gruppo 1 (n=8)			Gruppo 2 (n=8)		
	T0	T1	T0 vs. T1, p-value	T0	T1	T0 vs. T1, p-value
DHA, %	0.23 (0.19-0.38)	0.42 (0.32-0.49)	0.012	0.38 (0.21-0.57)	0.28 (0.20-0.50)	.208
EPA, %	0.10 (0.04-0.11)	0.11 (0.04-0.15)	0.036	0.14 (0.08-0.20)	0.10 (0.08-0.13)	.093
AA, %	0.48 (0.42-0.75)	0.43 (0.38-0.61)	0.017	0.65 (0.52-0.95)	0.60 (0.44-0.74)	.036

Tab.4 Valori mediani percentuali di acido docosaesaenoico (DHA), acido arachidonico (AA) e acido eicosapentaenoico (EPA) nei due gruppi a T0 e T1 e risultati del confronto intra - gruppo tra T0 e T1

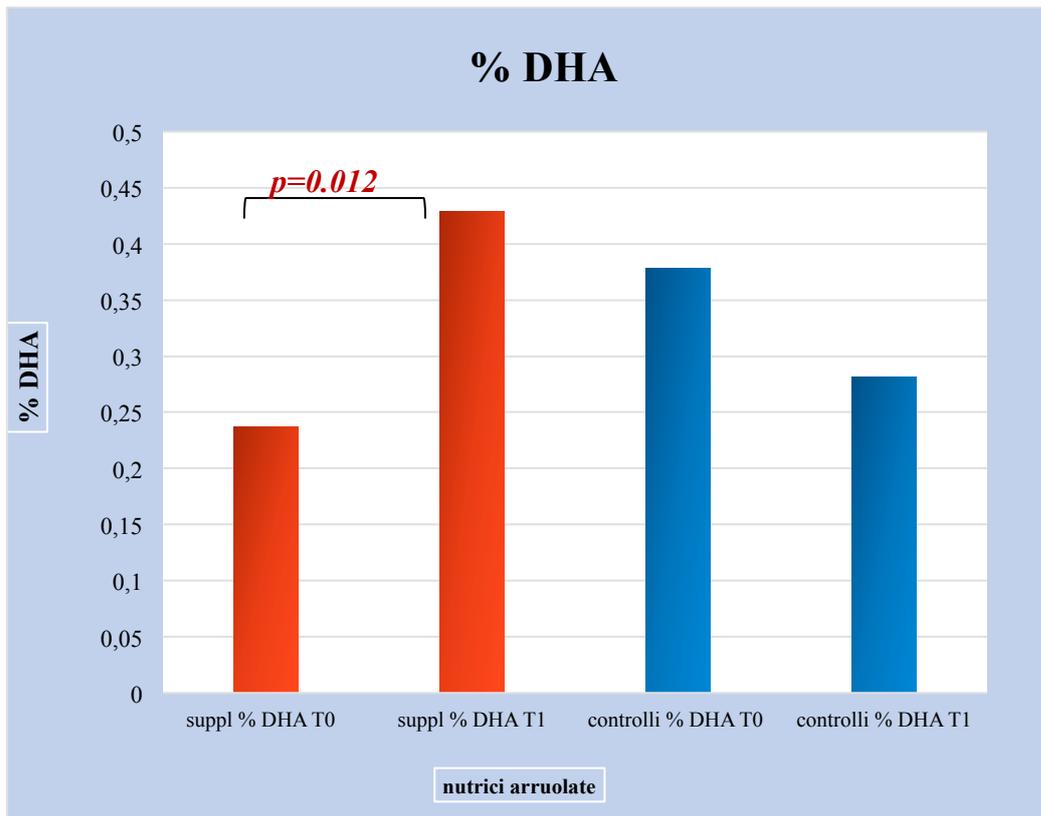


Fig. 6 Mediane dei valori % di DHA a T0 e T1 nel latte delle nutrici supplementate e in quelle ssegnate al gruppo di controllo.

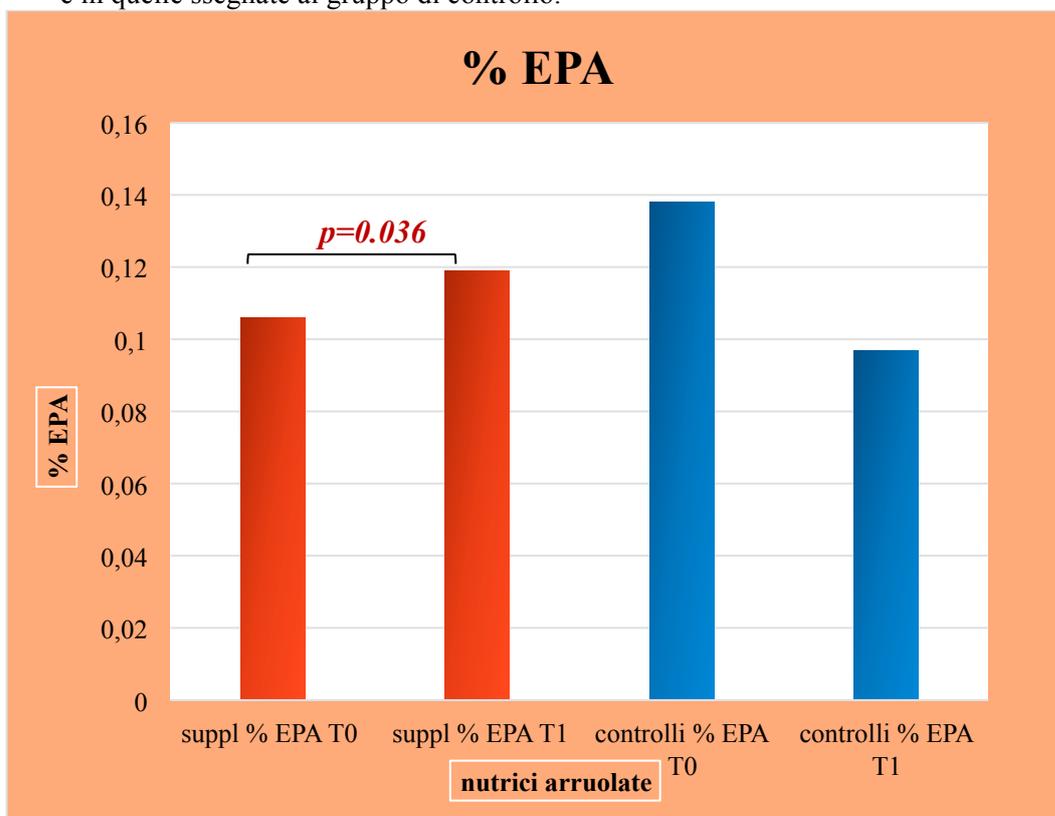


Fig.7 Mediane dei valori % di EPA a T0 e T1 nel latte delle nutrici supplementate e in quelle assegnate al gruppo di controllo.

Per confrontare i due gruppi previsti dallo studio, considerando l'influenza degli intake nutrizionali, è stato costruito un modello di regressione lineare modificato in cui sono state poste come variabili indipendenti il questionario nutrizionale (FFQ), il valore % di DHA ed EPA basale T0 e il trattamento, mentre come variabile dipendente la variazione fra il valore % di DHA ed EPA al T1 e al T0 ($\Delta\%$ DHA e $\Delta\%$ EPA). Tale modello ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nella variazione di valori % di DHA ($\Delta\%$ DHA, gruppo 1: mediana 64.2% [range interquartile, IQR: 27.5;134.6], gruppo 2: -7.8% [-12.1; -3.13], $p=0.025$) e di EPA rispetto al baseline ($\Delta\%$ EPA, gruppo 1: mediana 39% [IQR 15.7;73.4]; gruppo 2: mediana -25.62% [-32.7;-3.4], $p=0.035$) (Tabella 5). Pertanto, si può affermare che la supplementazione condotta nelle nutrici si dimostra efficace determinando una variazione significativa dei valori % di DHA ed EPA nel latte durante il periodo di trattamento. Otteniamo così un effetto positivo del trattamento in funzione del tempo, senza che i diversi apporti nutrizionali di LC-PUFA nelle nutrici e i diversi valori % di DHA ed EPA basali T0 tra i due gruppi, influenzino i valori ottenuti.

Variabile dipendente	Modello	B	SE B	Beta	t	P
$\Delta\%$ DHA	R^2 .495 <i>Costante</i>	2.331	55.345		.042	.967
	DHA intake con dieta	-7.860	14.416	-.135	-.545	.599
	Baseline %DHA	-10.435	123.660	-.022	-.084	.935
	Supplementazione	98.833	36.782	.666	2.687	.025
$\Delta\%$ EPA	R^2 .569 <i>Costante</i>	16,614	33,868		,491	,635
	EPA intake con dieta	-8,108	18,968	-,112	-,427	,679
	Baseline %EPA	-246.928	265,832	-,256	-,929	,377
	Supplementazione	60,321	24,395	,579	2,473	,035

Tab.5 Modello di regressione lineare per le variazioni percentuali di acido docosaesaenoico ($\Delta\%$ DHA) and acido eicosapentaenoico ($\Delta\%$ EPA) rispetto al baseline

Inoltre è stato calcolato il rapporto tra AA e DHA (AA:DHA) per ogni gruppo a T0 e T1. Tale valore fornisce informazioni riguardo il rapporto tra $n-6/n-3$ ed è un ulteriore indicatore della variazione dei valori di DHA. Come si evidenzia dalla figura 8, nel gruppo supplementato è stata osservata una significativa diminuzione del rapporto AA:DHA tra T0 e T1 ($p = 0.012$) indicativo di un aumento del DHA a T1

rispetto al gruppo di controllo ($p = 0.010$). Tale risultato conferma l'effetto positivo del trattamento sulla variazione del valore di DHA rispetto al basale.

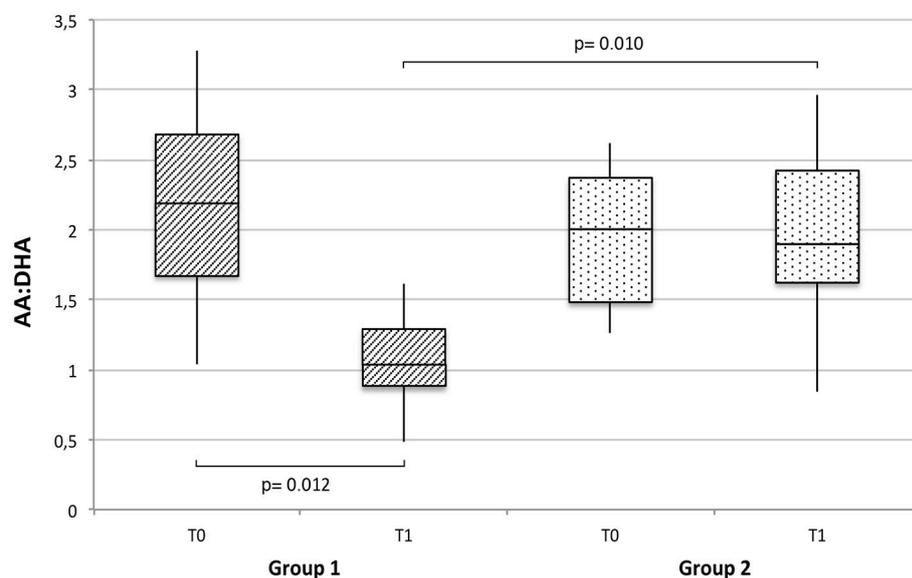


Fig.8 Rapporto tra acido arachidonico (AA) a acido docosaesaenoico (DHA) (AA:DHA), espresso come mediana, range interquartile e range a T0 e T1 nel latte di nutrici del gruppo supplementato (gruppo1) vs. il gruppo di controllo (gruppo 2).

Seconda fase

La *seconda fase* dello studio è stata intrapresa nel Luglio 2018 presso il reparto di Terapia Intensiva Neonatale e Neonatologia del nostro Policlinico. I pazienti sono stati arruolati consecutivamente, seguendo i criteri d'inclusione, raggiungendo un numero iniziale di 10 neonati, 2 dei quali sono stati esclusi nel corso dell'arruolamento per comparsa di ventricolomeglia su base malformativa congenita in un caso e nell'altro per grave infezione neonatale da citomegalovirus con esiti cerebrali. Il numero totale dei pazienti che hanno concluso l'arruolamento è stato pertanto di 8 neonati suddivisi in 2 gruppi; gruppo 1: 4 neonati ricevanti latte materno/donato supplementato con olio di Krill e gruppo 2: 4 neonati ricevanti latte materno/donato non supplementato e pertanto casi di controllo.

Le caratteristiche dei pazienti sono descritte nella tabella 6. Si precisa che tutti i

pazienti arruolati sono nati mediante taglio cesareo.

Caratteristiche neonati	EG (sett)	Peso (gr)	Sesso (M/F)	Ap 1'	Ap 5'	FEF (sett)	Supplementazione (sett)
GRUPPO 1-1	31	1071	F	8	9	34,28	5
GRUPPO 1-2	28,1	740	F	5	8	34,14	5
GRUPPO 1-3	26,85	581	F	7	8	29,42	10
GRUPPO 1-4	29,42	1456	F	7	10	31,14	5
GRUPPO 2-1	25,14	587	M	2	9	33,42	0
GRUPPO 2-2	31	1387	F	7	9	33	0
GRUPPO 2-3	27,42	707	F	7	9	32,71	0
GRUPPO 3-4	25,14	760	M	5	9	33,71	0
Mediana (min-max)	28,07 (25,14;31)	750 (581;1456)		7 (2;8)	9 (8;10)	33,21 (29,42;34,14)	5 (5;10)

Tab.6 Principali caratteristiche cliniche dei neonati nei due gruppi, rappresentati dai valori mediani e range (valore minimo e valore massimo). **EG**: età gestazionale; **FEF**: Full Enteral Feeding; **Ap**:Apgar score
GRUPPO 1: supplementato; **GRUPPO 2**: non supplementato

Non sono state evidenziate differenze significative in termini di caratteristiche generali tra i due gruppi. E' stata eseguita un'analisi statistica di tipo non parametrico (Mann-Whitney *U*-test) mettendo a confronto i valori % di DHA, EPA, AA, AA:DHA e degli acidi grassi totali polinsaturi, sia sui campioni di latte che su sangue, tra i due gruppi al tempo T0, T1, T2 senza evidenziare nessun risultato statisticamente significativo. Abbiamo inoltre calcolato eventuali differenze nei tre tempi di raccolta dei campioni all'interno dello stesso gruppo (test di Friedman) sia nei campioni di latte che sangue senza evidenziare differenze statisticamente significative. Dato il numero ristretto di pazienti tali risultati erano prevedibili e pertanto ci limiteremo a descrivere il campione in studio. Degli 8 pazienti che hanno portato a termine il follow-up longitudinale non di tutti e 8 abbiamo i campioni completi a T0,T1,T2 su latte e sangue e pertanto descriveremo solo i risultati dei pazienti con i dati completi alle tre diverse tempistiche.

Osservando il trend dei valori di DHA % su *latte*, nel gruppo di pazienti supplementato, nei tre tempi di raccolta, notiamo un aumento di tali valori da T0 a T2

in 2 pazienti su 3; nel gruppo di pazienti di controllo si osserva un calo dei valori di DHA % in 2 pazienti su 2. (tabella 7)

PAZIENTI	DHA% LATTE		
	T0	T1	T2
GRUPPO 1-2	0,5	0,4	0,3
GRUPPO 1-3	0,2	0,4	0,7
GRUPPO 1-4	0,3	0,4	0,4
GRUPPO 2-2	0,4	0,3	0,2
GRUPPO 2-4	0,4	0,2	0,2

Tab 7. Valori di DHA % su latte a T0, T1, T2. **GRUPPO 1:** supplementato; **GRUPPO 2:** non supplementato

Per quanto riguarda i valori di AA %, sia nel gruppo di pazienti supplementato che nel gruppo di controllo, si osserva un calo a T2 rispetto ai valori di partenza T0. Mentre i valori di EPA % risultano molto bassi (circa 0-0,2%) sia a T0 che T2 in entrambi i gruppi. Il rapporto AA:DHA, quale ulteriore indicatore dell'aumento del DHA, risulta calare nel gruppo di pazienti supplementati tra T0 e T2 mentre aumenta nel gruppo di controllo (tabella 8).

PAZIENTI	AA:DHA LATTE		
	T0	T1	T2
GRUPPO 1-2	1,6	1,4	1,6
GRUPPO 1-3	1,8	1,1	0,6
GRUPPO 1-4	2,3	1,5	0,8
GRUPPO 2-2	1,8	1,4	1,9
GRUPPO 2-4	1,25	1,5	1,5

Tab 8. Valori del rapporto AA:DHA su latte a T0, T1, T2. **GRUPPO 1:** supplementato; **GRUPPO 2:** non supplementato

Analizzando i dati ottenuti dai campioni di *sangue* osserviamo che il trend dei valori di DHA %, nel gruppo di pazienti supplementato nei tre tempi del prelievo, incrementa a T2 rispetto a T0 in 2 pazienti su 3 (tabella 9).

Gruppo SUPPLEMENTATO	DHA% SANGUE		
	T0	T1	T2
GRUPPO 1-2	5,3	5,6	6,6
GRUPPO 1-3	5,1	3,8	4,1
GRUPPO 1-4	6,4	5,7	6,5

Tab 9. Valori di DHA % su sangue a T0, T1, T2. **GRUPPO 1:** supplementato;

Confrontando i valori di AA % nei due gruppi osserviamo che nel gruppo supplementato si ha una riduzione dei valori a T2 rispetto a T0 maggiore che nel gruppo di controllo (tabella 10).

PAZIENTI	AA% SANGUE		
	T0	T1	T2
GRUPPO 1-2	22,5	16,5	19,1
GRUPPO 1-3	21,9	19,4	21,1
GRUPPO 1-4	23,2	23	20,8
GRUPPO 2-2	11,9	22,4	21,6
GRUPPO 2-3	22,9	19,7	19,7
GRUPPO 2-4	22,8	17,8	20,6

Tab 10. Valori di AA % su sangue a T0, T1, T2. **GRUPPO 1:** supplementato; **GRUPPO 2:** non supplementato

Per quanto riguarda il rapporto AA:DHA osserviamo una riduzione di tale rapporto a T2 rispetto T0 in 2 pazienti su 3 nel gruppo supplementato. Analogo trend si osserva nel gruppo di controllo.

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i due gruppi nei valori di LC-PUFA assunti attraverso la dieta e stimati mediante l'FFQ all'inizio dell'arruolamento.

Test di funzionalità visiva

La batteria di test visivi neonatali è stata somministrata a tutti i partecipanti di entrambi i campioni (gruppo 1 = 4; gruppo 2 = 4). Tra i due gruppi non sono presenti differenze statisticamente significative in termini di EG, peso alla nascita e Apgar score. La procedura è stata quasi sempre ben tollerata, da tutti i bambini. Le valutazioni eseguite a 33 settimane di EG hanno evidenziato maggiore difficoltà nell'esecuzione e completamento della testistica.

Generalmente il neonato è stato valutato prima dei pasti principali in uno stato comportamentale di veglia quieta o veglia attiva secondo Prechtl e inclinato di 30°. Nel corso della valutazione in reparto si è cercato di creare un ambiente il più tranquillo possibile, minimizzando i rumori e con luci soffuse in modo da favorire l'apertura degli occhi del paziente. In alcuni casi di stato comportamentale di dormiveglia o mancata collaborazione del paziente, la procedura è stata sospesa. Tutti i bambini hanno completato la batteria in un'unica somministrazione.

La valutazione visiva ha comportato alcuni missing data in funzione di uno stato comportamentale non idoneo alla valutazione e/o condizioni cliniche non di benessere. Degli 8 bambini reclutati alcuni non hanno eseguito tutte le somministrazioni previste dal protocollo. A 33 settimane di EG, per 2 bambini (25%) e a 35 settimane di EG per 1 bambino (12,2%), non è stato possibile somministrare la batteria visiva in quanto ancora assistiti dal punto di vista respiratorio con nCPAP, la quale impedisce di avere un campo visivo completo. A 37 settimane di EG per 3 bambini (37,5%) non è stato possibile eseguire la testistica per difficoltà di mantenimento dello stato di veglia attiva. A 40 settimane di EG e a 3 mesi di EC tutti i pazienti sono stati sottoposti alla testistica. A 6 mesi di EC, per 2 bambini (25%) non è stato possibile eseguire la testistica poiché non hanno ancora raggiunto l'età.

Confrontando i risultati ottenuti alle diverse età gestazionali per le variabili di scala continua tra i due gruppi (tabella 11), non si sono riscontrate differenze significative nell'esecuzione del test a 33, 35, 37 e 40 settimane di EG. Mentre abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative, con performance migliori nel gruppo 1 (supplementato) a 3 mesi di EC per quanto riguarda l'acuità visiva [t -2,32 (6-3,00), $p=0.13$] ottenuta mediante somministrazione delle carte Teller con cui si valuta la discriminazione di strisce in bianco e nero a frequenza spaziale crescente (da 0,32 a 3,2 cicli/grado) presentate come 8 diversi stimoli. I bambini del gruppo 1 hanno saturato la prestazione riuscendo a discriminare fino alla carta n. 8 mentre i bambini del gruppo 2 (controllo) fino a quella n. 6 (M =6,5 ds =1,2-0,6). Sempre all'EC di 3 mesi otteniamo performance significativamente migliori nel gruppo 1 nell'attenzione a distanza [t 0,397(6-3,00), $p=0.036$]; mostrando il target di riferimento a distanza crescente, il gruppo supplementato manteneva l'attenzione su tale target fino alla distanza media di 107,5 cm mentre il gruppo di controllo su quella media di 100 cm.

A 6 mesi di EC abbiamo riscontrato performance significativamente migliori di campo visivo nel gruppo 1. Il bambino si trovava seduto sul seggiolone o in braccio al genitore con capo bloccato, di fronte all'operatore, che richiamava la sua attenzione con un target bianco/nero; il secondo operatore, posizionato dietro al bambino, iniziava a muovere un target simile dalla porzione più periferica del campo di sguardo verso il centro. Il target veniva proposto nei quadranti laterali dx e sx, obliqui alti e bassi, destro e sinistro in maniera casuale per tre volte. Sono stati annotati i tre valori e considerato il valore medio. Il gruppo 1, supplementato, ha evidenziato valori medi significativamente maggiori sia per il campo visuale dx [t -1(4-2,00), $p=0.016$] che per quello sx [t -1(4-2,00), $p=0.016$] rispetto al gruppo 2 di controllo (Gruppo 1 90° vs Gruppo 2 70°). Infine, a 6 mesi di EC, il gruppo 2 ha evidenziato performance significativamente migliori nella sensibilità al contrasto (Hiding Heidi) [t -6,14(4-2,00), $p=0.016$]; nel corso di questo test venivano proposte al bambino, alla distanza di 1 metro, schede con uno specifico disegno a contrasto via

via inferiore a partenza dal 100%. S'interrompeva il test quando il bambino non mostrava più segni di attenzione allo stimolo. Il gruppo 1 ha mantenuto una sensibilità al contrasto media del 25% mentre il gruppo 2 al 7%.

ETA' TIPO DI TEST	GRUPPO 1 M (ds)	GRUPPO 2 M (ds)	T-TEST	
			t	p
33 settimane				
ACUITA' VISIVA TELLER	2,67 (.577)	3,67 (.57)	2,1(4-4,00)	1
ATTENZIONE A DISTANZA	25,00 (7,07)	35,00 (13,23)	0,94 (3-2,98)	,272
35 settimane				
ACUITA' VISIVA TELLER	3,33(2,51)	4,00 (1,4)	0,45 (5-2,94)	,363
ATTENZIONE A DISTANZA	36,60 (32,14)	62,50(17,07)	1,39 (5-2,85)	,187
37 settimane				
ACUITA' VISIVA TELLER	5,33 (1,52)	5,00 (1,41)	-2,45(3-2,42)	,844
ATTENZIONE A DISTANZA	71,67 (27,53)	80,00 (,00)	1,39 (5-2,85)	,187
40 settimane				
ACUITA' VISIVA TELLER	4,75 (1,25)	3,75 (2,06)	0,40 (3-2,00)	,533
ATTENZIONE A DISTANZA	70,00 (34,64)	55,00 (26,45)	-0,68 (6-5,61)	,680
3 mesi				
ACUITA' VISIVA TELLER	8,00 (,00)	6,50 (1,29)	-2,32(6-3,00)	,013
ATTENZIONE A DISTANZA	100,00 (,00)	107,50 (37,74)	0,397(6-3,00)	,036
6 mesi				
CAMPO VISIVO DESTRO	90,00 (,00)	75,00 (25,98)	-1(4-2,00)	016
CAMPO VISIVO SINISTRO	90,00 (,00)	70,00 (34,64)	-1(4-2,00)	,016
ACUITA' VISIVA TELLER	3,467 (1,22)	4,000 (1,38)	0,50 (4-3,93)	,692
STEREOPSI	600,00	450,00 (212,13)	-	-
SENSIBILITA' AL CONTRASTO (HH)	25,00 (,00)	7,08 (5,05)	-6,14(4-2,00)	,016
PUNTEGGIO DI FISSAZIONE TOTALE	217,00 (33,94)	231,67 (72,22)	0,25 (3-2,90)	,215
PUNTEGGIO DI INSEGUIMENTO TOTALE	11,50 (2,12)	12,33 (1,15)	0,59 (3-1,40)	,123

Tab.11 Rappresentazione dei risultati relativi alle variabili di scala continua in base all'età gestazionale nei due diversi gruppi. **GRUPPO 1:** supplementato, **GRUPPO 2:** controllo. **ds:** deviazione standard

I risultati relativi alle variabili ordinali sono rappresentati nella tabella 12 in cui sono stati analizzati gli item secondo l'EG di esecuzione. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nei due gruppi in nessuna delle variabili analizzati.

Tab 12. Tavole di contingenza

ETA'	<u>MOTILITA' OCULARE SPONTANEA</u>			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
33 settimane	CONIUGATA	N	2	1
		%	66,7%	33,3%
	STRABISMO	N	1	0
	INTERMITTENTE	%	100%	,0%
	STRABISMO CONTINUO	N	0	2
	%	,0%	100%	
	Chi-quadro			0,189
35 settimane	CONIUGATA	N	3	3
		%	50%	50%
	STRABISMO	N	0	1
	OCCASIONALE	%	,0%	100%
		Chi-quadro		
37 settimane	CONIUGATA	N	2	2
		%	50%	50%
	STRABISMO	N	1	0
	OCCASIONALE	%	100%	,0%
		Chi-quadro		
40 settimane	CONIUGATA	N	4	3
		%	57,1%	42,9%
	STRABISMO	N	0	1
	OCCASIONALE	%	,0%	100%
		Chi-quadro		
3 mesi	CONIUGATA	N	4	4
		%	50%	50%

Per quanto riguarda la *motilità oculare spontanea* a 33 settimane di EG, movimenti coniugati sono stati riscontrati nel 66,7% dei pazienti del gruppo supplementato e nel 33,3 % del gruppo di controllo. A 35, 37, 40 settimane di EG e 3 mesi di EC il 100% dei pazienti di entrambi i gruppo presentavano movimenti coniugati o strabismo occasionale.

ETA'	<u>MOTILITA' OCULARE</u> <u>AL TARGET</u>			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
33 settimane	CONIUGATA	N	1	1
		%	50%	50%
	STRABISMO	N	2	1
	INTERMITTENTE	%	66,7%	33,3%
	STRABISMO CONTINUO	N	0	1
	%	,0%	100%	
	Chi-quadro			,513
35 settimane	CONIUGATA	N	2	3
		%	40%	60%
	STRABISMO	N	0	1
	OCCASIONALE	%	,0%	100%
	STRABISMO	N	1	0
INTERMITTENTE	%	100%	,0%	
	Chi-quadro			,350
37 settimane	CONIUGATA	N	0	2
		%	,0%	100%
	STRABISMO	N	3	0
	OCCASIONALE	%	100%	,0%
	Chi-quadro			,025
40 settimane	CONIUGATA	N	3	3
		%	50%	50%
	STRABISMO	N	1	1
	OCCASIONALE	%	50%	50%
	Chi-quadro			,100
3 mesi	CONIUGATA	N	4	4
		%	50%	50%

A 33 settimane di EG la *motilità oculare al target* risulta coniugata o presenta strabismo occasionale nel 33,3 % in entrambi i gruppi, mentre a 35 settimane nel 66,7% nel gruppo supplementato e nel 100% nel gruppo di controllo. A 37, 40

settimane e 3 mesi di EC in entrambi i gruppi raggiunge il 100%.

ETA'	<u>FISSAZIONE</u>			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
33 settimane	STABILE	N	2	3
		%	40%	60%
	INSTABILE	N	1	0
		%	100%	,0%
	Chi-quadro			,273
35 settimane	STABILE	N	2	4
		%	33,3%	66,7%
37 settimane	STABILE	N	3	2
		%	60%	40%
40 settimane	STABILE	N	4	4
		%	50%	50%
3 mesi	STABILE	N	4	4
		%	50%	50%

La *fissazione* risulta stabile a tutte le età gestazionali per entrambi i gruppi tranne a 33 settimane di EG dove un paziente (33,3%) del gruppo supplementato ha evidenziato una fissazione instabile.

ETA'	<u>PUNTEGGIO TOTALE DI FISSAZIONE</u>			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
33 settimane	NORMALE	N	1	1
		%	50%	50%
	PATOLOGICO	N	2	2
		%	50%	50%
	Test fisher			,800
35 settimane	NORMALE	N	3	3
		%	50%	50%

	PATOLOGICO	N	0	1
		%	,0%	100%
	Test fisher			,571
37 settimane	NORMALE	N	2	2
		%	50%	50%
	PATOLOGICO	N	1	0
		%	100%	,0%
	Test fisher			,600
40 settimane	NORMALE	N	4	3
		%	57,1%	42,9%
	PATOLOGICO	N	0	1
		%	,0%	100%
	Test fisher			,500
3 mesi	NORMALE	N	4	4
		%	50%	50%

I punteggi totali di fissazione evidenziano infatti una immaturità a 33 settimane di EG in entrambi i gruppi e una normalizzazione del test nelle EG successive.

ETA'	<u>INSEGUIMENTO ORIZZONTALE AL TARGET</u>			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
33 settimane	COMPLETO	N	1	2
		%	33,3%	66,7%
	INCOMPLETO	N	1	1
		%	50%	50%
	ASSENTE	N	1	0
		%	100%	,0%
	Chi-quadro			,513
35 settimane	COMPLETO	N	2	2
		%	50%	50%
	INCOMPLETO	N	0	1
		%	,0%	100%

	PARZIALE	N	1	1
		%	50%	50%
	Chi-quadro			,646
37 settimane	COMPLETO	N	3	2
		%	60%	40%
40 settimane	COMPLETO	N	4	4
		%	50%	50%
3 mesi	COMPLETO	N	4	4
		%	50%	50%

Per l'inseguimento orizzontale al target a 33 e 35 settimane di EG si osservano performance incomplete, assenti o parziali in entrambi i gruppi. Nelle EG successive si osserva una normalizzazione all'esecuzione del test in entrambi i gruppi

ETA'	<u>INSEGUIMENTO VERTICALE AL TARGET</u>			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
33 settimane	COMPLETO	N	0	1
		%	,0%	100%
	INCOMPLETO	N	1	0
		%	100%	,0%
	PARZIALE	N	0	1
		%	,0%	100%
	ASSENTE	N	2	1
		%	66,7%	33,3%
	Chi-quadro			,343
35 settimane	COMPLETO	N	2	2
		%	50%	50%
	INCOMPLETO	N	0	2
		%	,0%	100%
	PARZIALE	N	1	0
		%	100%	,0%
	Chi-quadro			,233
37 settimane	COMPLETO	N	2	1

		%	66,7%	33,3%
	INCOMPLETO	N	1	0
		%	100%	,0%
	PARZIALE	N	0	1
		%	,0%	100%
	Chi-quadro			,329
40 settimane	COMPLETO	N	3	3
		%	50%	50%
	INCOMPLETO	N	1	1
		%	50%	50%
	Chi-quadro			1,000
3 mesi	COMPLETO	N	4	4
		%	50%	50%

Per l'inseguimento verticale al target a 33, 35, 37 e 40 settimane di EG si osservano performance incomplete, assenti o parziali in entrambi i gruppi. Solo a 3 mesi di EC si osserva una normalizzazione all'esecuzione del test in entrambi i gruppi.

ETA'	INSEGUIMENTO AD ARCO DEL TARGET		GRUPPO 1		GRUPPO 2	
			SUPPLEMENTATO		CONTROLLO	
33 settimane	COMPLETO	N	0	1		
		%	,0%	100,0%		
	INCOMPLETO	N	0	1		
		%	,0%	100,0%		
	PARZIALE	N	0	1		
		%	,0%	100,0%		
	ASSENTE	N	3	0		
		%	100%	,0%		
	Chi-quadro			,112		
35 settimane	COMPLETO	N	0	2		
		%	,0%	100%		
	INCOMPLETO	N	1	1		
		%	50%	50%		

	PARZIALE	N	2	0
		%	100%	,0%
	ASSENTE	N	0	1
		%	,0%	100%
	Chi-quadro			,175
37 settimane	COMPLETO	N	0	1
		%	,0%	100%
	INCOMPLETO	N	1	0
		%	100%	,0%
	PARZIALE	N	1	1
		%	50%	50%
	ASSENTE	N	1	0
		%	100%	,0%
	Chi-quadro			,405
40 settimane	COMPLETO	N	1	1
		%	50%	50%
	INCOMPLETO	N	1	2
		%	33,3%	66,7%
	PARZIALE	N	1	0
		%	100,0%	,0%
	ASSENTE	N	1	1
		%	50%	50%
3 mesi	COMPLETO	N	4	4
		%	50%	50%

Anche per *l'inseguimento ad arco al target* a 33, 35, 37 e 40 settimane di EG si osservano performance incomplete, assenti o parziali in entrambi i gruppi. Solo a 3 mesi di EC si osserva una normalizzazione all'esecuzione del test in entrambi i gruppi.

ETA'	<u>PUNTEGGIO TOTALE</u> <u>AGLI INSEGUIMENTI</u>			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
33 settimane	NORMALE	N	3	2
		%	60%	40%
	PATOLOGICO	N	0	1
		%	,0%	100%
	Test fisher			,500
35 settimane	NORMALE	N	2	2
		%	50%	50%
	PATOLOGICO	N	1	2
		%	33,3%	66,7%
	Test fisher			,629
37 settimane	NORMALE	N	2	2
		%	50%	50%
	PATOLOGICO	N	1	0
		%	100%	,0%
	Test fisher			,600
40 settimane	NORMALE	N	3	3
		%	50%	50%
	PATOLOGICO	N	1	1
		%	50%	50%
	Test fisher			,786
3 mesi	NORMALE	N	4	4
		%	50%	50%

Per il *punteggio totale d'inseguimento* a 33 settimane di EG si osservano performance normali nel 100% del gruppo supplementato mentre il 66,7% nel gruppo di controllo. A 35 settimane di EG il 66,7% dei pazienti ha una performance normale nel gruppo supplementato e il 50% nel gruppo di controllo. A 37 settimane di EG il 66,7 % del gruppo supplementato ha una performance normale mentre il 100% nel gruppo di controllo. A 40 settimane di EG per entrambi i gruppi il 66,7 % ha eseguito una performance normale mentre a 3 mesi di di EC tutti i pazienti di entrambi i

gruppi hanno mostrato performance normali.

ETA'	INSEGUIMENTO DELLO STIMOLO COLORATO			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
33 settimane	PRESENTE	N	3	3
		%	50%	50%
35 settimane	PRESENTE	N	3	3
		%	50%	50%
37 settimane	PRESENTE	N	3	2
		%	60%	40%
40 settimane	PRESENTE	N	4	4
		%	50%	50%
3 mesi	PRESENTE	N	4	4
		%	50%	50%

L'inseguimento allo stimolo colorato per entrambi i gruppi a tutte le EG risulta presente.

I risultati delle variabili ordinali del test eseguito a 6 mesi sono descritti nella tabella 13. Il setting è rappresentato dall'ambulatorio specialistico dove vengono eseguiti regolarmente i test di neurosviluppo, normoilluminato. 3 bambini (37,5%) del gruppo di controllo e 1 (12,5%) del gruppo supplementato hanno eseguito il test in braccio ai genitori mentre 2 bambini (25%) del gruppo supplementato sul seggiolone. Per tutti gli item è stato mostrato un target in bianco e nero.

Tab. 13 Tavole di contingenza 6 mesi EC

6 mesi	FISSAZIONE			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	STABILE	N	0	1
		%	0%	100%
	PRESENTE	N	3	2
		%	60%	40%

6 mesi	DIREZIONE DELLO SGUARDO DIFISSAZIONE			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	POSIZIONE	N	3	3
	PRIMARIA	%	50%	50%

6 mesi	INSEGUIMENTO ORIZZONTALE			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	COMPLETO	N	3	3
		%	50%	50%

6 mesi	INSEGUIMENTO VERTICALE			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	COMPLETO	N	3	3
		%	50%	50%

6MESI	INSEGUIMENTO AD ARCO			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	COMPLETO	N	3	3
		%	50%	50%

6MESI	MOVIMENTI SACCADICI ORIZZONTALI			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	COMPLETO	N	3	3
		%	50%	50%

6MESI	MOVIMENTI SACCADICI VERTICALI			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	COMPLETO	N	3	3
		%	50%	50%

6MESI	FISSAZIONE MANUALE NON COMPETITIVA			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	PRESENTE	N	3	3
		%	50%	50%

6MESI	FISSAZIONE MANUALE COMPETITIVA			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	PRESENTE	N	3	3
		%	50%	50%

6MESI	MOTILITA' OCULARE SPONTANEA E AL TARGET			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	NORMALE	N	3	3
		%	50%	50%

6MESI	POSIZIONE DEL CAPO E DELLO SGUARDO			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	IN ASSE	N	3	3
		%	50%	50%

6MESI	POSIZIONE PREFERENZIALE DELLO SGUARDO			
			GRUPPO 1 SUPPLEMENTATO	GRUPPO 2 CONTROLLO
	ASSENTE	N	3	3
		%	50%	50%

A 6 mesi di EC si è osservata una omogeneità nell'esecuzione del test; in entrambi i gruppi si sono evidenziate performance adeguate per tutti gli item proposti.

Successivamente abbiamo analizzato le correlazioni di Pearson significative tra le caratteristiche neonatali, quali EG e IUGR, in relazione ai diversi item in base all'EG.

I test eseguiti a 33 settimane di EG hanno evidenziato che la motilità oculare

spontanea correla positivamente con lo IUGR indicando che i pazienti con IUGR hanno una motilità oculare meno stabile, mentre l'attenzione a distanza correla negativamente con l'EG, indicando che tanto inferiore è l'età gestazionale tanto inferiore sarà l'attenzione a distanza.

I test eseguiti a 35 settimane di EG hanno evidenziato che i punteggi totali di inseguimento correlano positivamente con l'EG indicando che tanto maggiore sarà l'età gestazionale tanto maggiori saranno i punteggi totali di inseguimento. A 37 settimane di EG l'inseguimento verticale e il punteggio totale della distanza correlano positivamente con l'EG, indicando che tanto maggiore è l'età gestazionale migliore la capacità di inseguimento del target verticale del punteggio totale di distanza. Infine a 6 mesi di EC il punteggio di inseguimento totale correla negativamente con l'EG mentre correla positivamente con lo IUGR, indicando che tanto minore è l'età gestazionale o il paziente è IUGR, quanto peggiore sarà il punteggio di inseguimento totale.

Infine per quanto riguarda la valutazione psicomotoria effettuata mediante le Scale di Sviluppo Mentale Griffiths 0-2 (tabella 14) a 6 mesi di EC, i risultati ottenuti mediante *t-test* hanno mostrato punteggi sovrapponibili nei due gruppi, senza evidenziare differenze statisticamente significative.

Scale di Sviluppo Mentale Griffith a 6 mesi		N	Media	Deviazione standard
	Gruppo			
Sviluppo psicomotorio generale	Gruppo 1	3	105,0	12,1
	Gruppo 2	3	95,6	15,5
Scala locomotoria	Gruppo 1	3	105,6	10,0
	Gruppo 2	3	95,3	14,4
Scala personale-sociale	Gruppo 1	3	106,3	11,0
	Gruppo 2	3	97	13,0
Scala udito-linguaggio	Gruppo 1	3	118	7,0
	Gruppo 2	3	111	14,0
Scala coordinazione oculomotoria	Gruppo 1	3	96,6	14,1
	Gruppo 2	3	81,3	15,2
Scala performance cognitiva	Gruppo 1	3	96,3	18,3
	Gruppo 2	3	78,3	9,2

Tab. 14 Punteggi medi e deviazione standard delle scale di sviluppo mentale Griffith.

2.4 DISCUSSIONE

La *prima fase* del nostro studio ha dimostrato, in accordo con *Sherry GR et al.* e *Gibson RA et al.*, che la supplementazione materna per 30 giorni con olio di pesce e olio di krill determina un incremento significativo dei valori % di EPA e DHA nel latte materno. Inoltre, l'effetto positivo del trattamento in funzione del tempo è risultato dipendente esclusivamente dalla supplementazione effettuata nell'arco dei 30 giorni.

Il latte materno è considerato l'elemento nutrizionale più indicato, specie specifico, per l'alimentazione del neonato a termine e pretermine; il contenuto di LC-PUFA nel latte materno è strettamente legato alla dieta materna e all'età gestazionale a cui è avvenuto il parto. L'efficacia degli LCPUFA n-3, ed in particolare del DHA, sullo sviluppo delle strutture visive e cerebrali è ormai nota: pertanto risulta evidente come scarsi introiti materni di LC-PUFA con la dieta, determinino scarsi livelli di DHA a livello della corteccia cerebrale e delle membrane retiniche con possibili conseguenze negative sulla funzione visiva e cognitiva del neonato ⁽²⁹⁾.

Secondo *Kovàsc et al.*, il contenuto in LC-PUFA nel latte delle mamme dei neonati pretermine risulta maggiore rispetto a quello presente nel latte delle mamme di neonati a termine. Tale differenza è conseguenza del fatto che la concentrazione di acidi grassi polinsaturi nel latte dipende dalle riserve di acidi grassi nella donna; tali riserve sono estremamente più abbondanti nelle mamme di neonati pretermine in quanto hanno subito solo in parte o non hanno subito affatto il depauperamento causato dal trasferimento transplacentare di LC-PUFA durante il terzo trimestre di gravidanza⁽³²⁾. Nel terzo trimestre di gravidanza si assiste inoltre ad uno scatto di crescita delle strutture cerebrali strettamente condizionate dalla quota di DHA fetale⁽⁴⁵⁾. Nel neonato pretermine pertanto, il mancato passaggio transplacentare di DHA dell'ultimo trimestre di gravidanza, si può associare ad un aumento del rischio di comparsa di emorragia intraventricolare (IVH)⁽³⁰⁾, sepsi tardiva e broncodisplasia ⁽³¹⁾.

In accordo con una recente meta analisi, la supplementazione materna con DHA, in

corso di allattamento, si associa a migliori performance neuromotorie a 3 anni di vita e migliori capacità di attenzione a 5 anni rispetto al gruppo di controllo ^(33,34).

E' noto che la supplementazione materna con olio di pesce durante l'allattamento sia in grado di incrementare i valori di DHA sia nel latte che nel plasma ^(35,36,37,39); la particolarità del nostro studio è stata quella di utilizzare una supplementazione combinata con olio di Krill ed olio di pesce; l'olio di Krill (*Antarctic Krill*) infatti sembra essere più efficace in quanto possiede un migliore assorbimento giustificato dalla sua composizione chimica in cui gli LC-PUFA vengono legati ai fosfolipidi (principalmente alla fosfatidilcolina)^(38,40) determinando una maggiore biodisponibilità della molecola.

I dati ottenuti confermano che la supplementazione combinata con olio di pesce ed olio di krill è in grado di incrementare i contenuti % di DHA ed EPA nel latte materno rispetto al gruppo di controllo. I valori % di AA diminuiscono in maniera significativa in entrambi i gruppi; tale risultato è giustificato dalla progressiva diminuzione del contenuto di LC-PUFA nel latte con il procedere della lattazione ⁽⁴¹⁾. Inoltre, gli LC-PUFA n-3 quali EPA e DHA, agiscono come substrato enzimatico competitivo nel metabolismo dell'acido arachidonico⁽⁴²⁾ determinando un ulteriore calo significativo dei valori % di AA nel gruppo di nutrici supplementate.

E' stato inoltre valutato il rapporto AA:DHA quale ulteriore indicatore della variazione dei valori di DHA nei campioni di latte ⁽³⁵⁾: la sua diminuzione riflette ulteriormente l'effetto biologico degli LC-PUFA n-3 in relazione all'effetto della competizione enzimatica appena descritta⁽⁴³⁾. Studi effettuati su ratti neonati hanno dimostrato che i cambiamenti dietetici determinati da variazioni nel rapporto n-6/n-3 causano un'alterazione significativa dello sviluppo neuronale, della glia e dello sviluppo dei fotorecettori della retina ^(44,45). Studi condotti su neonati pretermine confermano che elevati livelli di DHA e bassi livelli di LA a livello ematico nelle prime settimane di vita, determinano una riduzione del rapporto AA:DHA correlandosi con un migliore sviluppo delle microstrutture cerebrali, ridotto rischio di IVH e migliori punteggi ai test di sviluppo nel corso del follow-up neuroevolutivo ⁽³⁰⁾.

Pertanto, in accordo con i dati della letteratura è fondamentale in questi pazienti cercare di mantenere adeguati livelli di DHA a livello ematico al fine di ottenere un migliore sviluppo delle strutture cerebrali e pertanto migliori outcome dello sviluppo neuromotorio ⁽³⁰⁾.

In accordo con i nostri dati preliminari, la supplementazione materna combinata con olio di pesce e olio di krill, può rappresentare una strategia per incrementare i livelli di DHA sia nel latte materno di madri di neonati pretermine ma anche nel latte materno di madri donatrici della BLUD, il cui latte è utilizzato come prima scelta per l'alimentazione dei neonati pretermine ricoverati in Terapia Intensiva Neonatale, qualora il latte della mamma non fosse sufficiente. Il latte donato della BLUD infatti, in accordo con i dati in letteratura, sembra non raggiungere adeguati livelli di DHA fondamentali per la popolazione di neonati pretermine ⁽⁴⁷⁾.

Sicuramente la prima fase del nostro studio presenta della criticità, tra cui il mancato calcolo del simple size dovuto alla natura pilota dello studio: il calcolo *post-hoc* eseguito sulla base dei valori % di DHA ha comunque mostrato un potere dello studio totale pari al 66,5%, considerando che se avessimo arruolato 10 madri per gruppo anziché 8 avremmo ottenuto un potere pari all'80%.

Inoltre il nostro studio si è limitato a valutare la quota di LC-PUFA nel latte materno senza considerare i valori plasmatici ed infine l'utilizzo della supplementazione combinata non ci permette di definire quale sia stato l'impatto della componente dell'olio di pesce o dell'olio di krill sull'incremento dei valori % di EPA e DHA.

Nonostante i limiti dello studio, i dati ottenuti da questa prima fase sono però promettenti e hanno posto le base per procedere alla seconda fase dello studio.

La *seconda fase* dello studio ha raccolto un campione di pazienti limitato per poter giungere a delle conclusioni significative. Si tratta di uno studio randomizzato controllato in cieco il quale ha previsto una stretta osservazione e un lungo follow up del paziente; pertanto, nonostante i pazienti arruolati siano un numero limitato su cui effettuare analisi statistiche, siamo comunque soddisfatti della numerosità dei dati

ottenuti. I campioni totali raccolti inoltre non sono completi per ogni pazienti a causa della difficoltà nel reperire specialmente il campione di latte materno il quale, per le mamme dei neonati prematuri, è di più difficile raccolta. La mancanza di latte nella mamma del neonato prematuro ha spesso un'eziologia multifattoriale: possibile parto cesareo, trauma psicologico nella mamma a causa di una nascita precoce e inaspettata che incide sulla produzione di latte, minore stimolo del seno a causa dell'uso del tiralatte, conseguenza della suzione non valida nel neonato prematuro fino alle 32-33 settimane e dell'impossibilità all'allattamento al seno nelle prime fasi della vita nel neonato prematuro.

Osservando i trend dei valori sui campioni di *latte materno* possiamo confermare quanto avevamo osservato nella prima fase dello studio⁽⁴⁸⁾: i valori di DHA %, nel gruppo supplementato, tendono ad aumentare o rimanere stabili a differenza dei valori osservati nel gruppo di controllo che, in accordo con i dati della letteratura, tendono progressivamente a calare nel tempo. In accordo con i dati ottenuti nella prima parte dello studio, i valori AA% tendono a calare maggiormente nel gruppo supplementato, così come il rapporto AA:DHA, mentre non abbiamo osservato un trend in aumento, come ci saremmo aspettati, per il valori di EPA%.

Anche i dati su *sangue*, seppur limitati, evidenziano che nel 66,6% dei pazienti il trend dei valori è in aumento. Siamo consapevoli che i dati non sono ancora sufficienti per trarre delle conclusioni di uno studio il cui disegno è articolato e unico: la supplementazione con olio di krill infatti non viene direttamente assunta dal neonato ma attraverso la via più fisiologica, il latte materno della propria mamma. Con quale tempistica e modalità gli LC-PUFA contenuti nel latte materno raggiungano l'intestino del neonato ed entrino nel circolo ematico, non siamo ancora in grado di definirlo. Inoltre abbiamo osservato quali dati potessero influenzare tale risultato, come ad esempio l'infusione di lipidi attraverso la nutrizione parenterale; tutti i pazienti, sia supplementati che non, a T0 ricevevano lipidi per via parenterale. Nessun paziente ha ricevuto miscele contenenti omega-3 ma miscele contenenti olio di soia raffinato e trigliceridi a media catena normalmente utilizzate nella pratica

quotidiana in reparto. Le modalità di somministrazione del latte inoltre non differivano nei diversi pazienti (prevalentemente sondino orogastrico a gavage).

Sicuramente possiamo ribadire l'importanza dell'adeguato apporto di LC-PUFA e specialmente del DHA per le donne in gravidanza e in corso di allattamento. Ancora più importante è il mantenimento di un'adeguata quota di LC-PUFA nel neonato, specialmente prematuro, e quindi di un'eventuale supplementazione della dieta della nutrice per mantenere livelli costanti nel latte nel tempo.

Per quanto riguarda la *batteria visiva*, in accordo con *Ricci et al.* ⁽¹⁹⁾, quanto più l'età gestazionale postconcezionale di esecuzione della testistica è precoce, quanto più le performance visive sono ancora deficitarie. La crescita extrauterina e in particolare gli stimoli a cui il neonato è sottoposto, sono fondamentali per una progressiva maturazione di alcune aree visive con conseguente ottimizzazione delle performance visive. In particolare quanto è stato osservato dai nostri risultati evidenzia come il gruppo supplementato all'età corretta di 3 e 6 mesi, dimostri una migliore acuità visiva, attenzione a distanza, adeguato campo visivo e migliore sensibilità al contrasto: l'intervento sperimentale sembra aver aiutato lo sviluppo visivo permettendo di migliorare la capacità di attenzione selettiva, precursore per un'adeguata coordinazione visus-motoria e pertanto una componente fondamentale per un buon sviluppo psicomotorio.

Ovviamente non possiamo non considerare l'età gestazionale alla nascita come fattore determinante per un migliore o peggiore outcome visivo⁽²⁾. Le correlazioni effettuate infatti confermano come tanto più bassa è l'età gestazionale alla nascita tanto peggiori saranno le performance visive, in particolare quelle che risentono maggiormente dell'esperienza extrauterina (movimenti oculari al target orizzontale e arco) e pertanto se eseguite precocemente verosimilmente daranno risultati non ottimali. Per quanto i dati ottenuti siano limitati, ciò che abbiamo osservato è che la supplementazione con olio di Krill, supporta lo sviluppo visivo e pertanto psicomotorio evidenziando migliori capacità di sviluppo tardive (3-6 mesi di EC).

Quello che ci aspettiamo, implementando il campione, è di caratterizzare item deficitari il più precocemente possibile, in modo tale da personalizzare e iniziare rapidamente un eventuale percorso abilitativo.

I limiti della seconda fase dello studio sono rappresentati da un campione ancora ristretto di pazienti con dati di follow up completo su cui non è possibile eseguire analisi multivariate.

In conclusione possiamo affermare che la supplementazione con olio di Krill nella nutrice incrementa i livelli di DHA% nel LM, i quali fisiologicamente tendono a diminuire con il trascorrere della lattazione. La popolazione pretermine, maggiormente a rischio per deficit neurologici e visivi, è più suscettibile alle azioni extrauterine coinvolte nella maturazione del sistema nervoso centrale e della retina. Pertanto garantire a tale popolazione un adeguato apporto di LC-PUFA, direttamente attraverso la somministrazione di LM, potrebbe aiutare a favorire un regolare sviluppo del sistema nervoso e visivo fondamentale per il raggiungimento di uno sviluppo neuropsicologico regolare. Siamo consapevoli che i dati preliminari, ottenuti dalla seconda fase dello studio, siano incompleti e limitati e pertanto non sono sufficienti per trarre delle conclusioni. Il nostro obiettivo futuro è quello di proseguire nell'arruolamento al fine di ottenere un campione di pazienti sufficiente per raggiungere dati statisticamente significativi.

3. ABBREVIAZIONI

EG: età gestazionale

EC: età corretta

PN: peso neonatale

VLBW: very low birth weight

IVH: emorragia intraventricolare

OR: odd ratio

IQR: range interquartile

LC-PUFA: long chain polyunsaturated fatty acids - acidi grassi polinsaturi a lunga catena

IUGR: ritardo di crescita intrauterino

BLUD: banca del latte umano donato

HACCP: analisi dei pericoli e punti di controllo critici

DHA: acido docosaesaenoico

AA: acido arachidonico

EPA: acido eicosapentaenoico

LA: acido linoleico

SNC: sistema nervoso centrale

ALA: acido α -linolenico

GC-MS: gascromatografia-spettrometria di massa

FFQ: food frequency questionnaire

C.R.B.A.: centro di ricerca biomedica applicata

A.O.U.: azienda ospedaliera universitaria

TIN: Terapia Intensiva Neonatale

4. BIBLIOGRAFIA

1. Sansavini, Faldella "Lo sviluppo nei bambini nati pretermine –aspetti neuropsicologici, metodi di valutazione ed interventi", 2013 FrancoAngeli Ed.
2. Ricci D, Romeo DM, Serrao F, et al. "Early assessment of visual function in preterm infants: how early is early? *Hearly Hum Dev*, 2010;86:29-33
3. Ricci D, Romeo DM, Serrao F et al. "Application of a neonatal assessment of visual function in a population o low risk full term newborn. *Hearly Hum Dev* 2008;84(4):277-280
4. Bassi L, Ricci D, Volzone A et al. "Probabilistic diffusion tractography of the optic radiation and visual function in preterm infant at term equivalent age". *Brain* 2008;131 (pt2):573-582
5. Bhutta AT, Cleves MA,Casei PH et al. "Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm: a meta-analysis". *JAMA* 2002;288(6):728-737
6. O'Connor AR, Fieldet AR. "Visual outcomes and perinatal adversity" *Semin Fetal Neonatal Med* 2007;12(5):408-414
7. O'Connor AR, Fieldet AR. "Long term ophtalmic sequelae of prematurità" *Early Hum Dev* 2008;84(2):101-106
8. Makrides M, Gibson RA, McPhee AJ et al.,"Neurodevelopmental outcomes of preterm infants fed high-dose docosahexaenoic acid: a randomized controlled trial" *JAMA* 2009;301(2):175–182.
9. Qawasmi A, Landeros-Weisenberger A, Bloch MH."Meta-analysis of LCPUFA supplementation of infant formula and visual acuity". *Pediatrics* 2013;131(1):e262-72
10. Agostoni C1, Trojan S, Bellù R, Riva E, Giovannini M. "Neurodevelopmental quotient of healthy term infants at 4 months and feeding practice: the role of long-chain polyunsaturated fatty acids". *Pediatr Res*. 1995;38(2):262-6.
11. O'Connor DL1, Hall R, Adamkin D, Auestad N, Castillo M, Connor WE, Connor SL, Fitzgerald K, Groh-Wargo S, Hartmann EE, Jacobs J, Janowsky J, Lucas A, Margeson D, Mena P, Neuringer M, Nesin M, Singer L, Stephenson T, Szabo J, Zemon V; Ross Preterm Lipid Study. "Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial" *Pediatrics*. 2001;108(2):359-71.

12. Makrides M, Neumann M, Simmer K, Pater J, Gibson R. "Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy?" *Lancet*. 1995 Jun 10;345(8963):1463-8.
13. Faldella G, Govoni M, Alessandroni R, Marchiani E, Salvioli GP, Biagi PL, Spano C. "Visual evoked potentials and dietary long chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1996;75(2):F108-12.
14. Koletzko B, Cetin I, Brenna JT. "Dietary fat intakes for pregnant and lactating women". *Br J Nutr* 2007; 98:873-877
15. Sherry CL, Oliver JS, Marriage BJ. "Docosahexanoic acid supplementation in lactating women increases breast milk and plasma docosahexaenoic acid concentrations and alters infant omega 6:3 fatty acid ratio." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015;95:63-9.
16. Ulven SM, Kirkhus B, Lamglait A et al. "Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but at lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers". *Lipids*
17. Dubovitz LM, Dubovitz V, Morante A, Verghote M. "Visual function in the preterm and full term newborn infant." *Dev Med Child Neurol* 1980. Aug;22(4):465-75
18. Brazelton TB. "Neontal behavioural assessment scale". *Clinics in Developmental Medicine* No. 50. London, England. William Medical Books; 1973
19. Ricci D, Cesarini L, Romeo DM, et al. "Visual function at 35 and 40 weeks' postmenstrual age in low risk preterm infant". *Pediatrics* 2008.
20. Moore D.R "Auditory processing disorder: acquisition and treatment" *Journal of Communication Disorders*, 2007. 40:295-330
21. Bronson G, "The postnatal growth of visual capacity", *Child Development*, 1974, 45:873-890
22. Atkinson J, "The Developing Visual Brain", Oxford University Press, 2000, New York.
23. Romeo DM, Ricci D, Serrao D, et al. 'Visual function assessment in late - preterm newborns'. *Early Human Dev* 88(2012) 301 - 305

24. Marangoni F, Cetin I, Verduci E, Canzone G, Giovannini M, Scollo P, Corsello G, Poli A. Maternal Diet and Nutrient Requirements in Pregnancy and Breastfeeding. An Italian Consensus Document. *Nutrients* (2016) 8:629.
25. FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larqué E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr.* (2008) 27:685–93.
26. Salas AA, Carlo WA, Ambalavanan N, Nolen TL, Stoll BJ, Das A, et al. Gestational age and birthweight for risk assessment of neurodevelopmental impairment or death in extremely preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* (2016) 2016:fetalneonatal-2015-309670.
27. Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T, et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (2010) 50:85–91.
28. LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O’Hare D, Schanler RJ, et al. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* (2012) 129:e827-41.
29. Molloy C, Doyle LW, Makrides M, Anderson PJ. Docosahexaenoic acid and visual functioning in preterm infants: a review. *Neuropsychol Rev.* (2012) 22:425–37.
30. EWY, Chau V, Barkovich AJ, Ferriero DM, Miller SP, Rogers EE, et al. Early postnatal docosahexaenoic acid levels and improved preterm brain development. *Pediatr Res.* (2016) 79:723–30.
31. Martin CR, Dasilva DA, Cluette-Brown JE, Dimonda C, Hamill A, Bhutta AQ, et al. Decreased postnatal docosahexaenoic and arachidonic acid blood levels in premature infants are associated with neonatal morbidities. *J Pediatr.* (2011) 159:743–9.e1–2.
32. Kovacs A, Funke S, Marosvölgyi T, Burus I, Decsi T. "Fatty Acids in Early Human Milk after Preterm and Full-Term Delivery" *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* October 2005 - Volume 41 - Issue 4 - p 454-459
33. Q, Cui Q, Yan C. The effect of supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids during lactation on neurodevelopmental outcomes of preterm infant from infancy to school age: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Neurol.* (2016) 59:54–61.e1.

34. Jensen CL, Voigt RG, Llorente AM, Peters SU, Prager TC, Zou YL, et al. Effects of early maternal docosahexaenoic acid intake on neuropsychological status and visual acuity at five years of age of breast-fed term infants. *J Pediatr.* (2010) 157:900–5.
35. Sherry CL, Oliver JS, Marriage BJ. Docosahexaenoic acid supplementation in lactating women increases breast milk and plasma docosahexaenoic acid concentrations and alters infant omega 6:3 fatty acid ratio. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2015) 95:63–9.
36. Fidler N, Sauerwald T, Pohl A, Demmelmair H, Koletzko B. Docosahexaenoic acid transfer into human milk after dietary supplementation: a randomized clinical trial. *J Lipid Res.* (2000) 41:1376–83.
37. CJ, Morrow G, Pennell M, Morrow AL, Hodge A, Haban-Bartz A, et al. Randomized controlled trial of docosahexaenoic acid supplementation in midwestern U.S. human milk donors. *Breastfeed Med.* (2013) 8:86–91.
38. Med Rev. 2010 Apr;15(1):84-6."Krill oil. Monograph."
39. Dunstan JA, Mitoulas LR, Dixon G, Doherty DA, Hartmann PE, Simmer K, et al. The effects of fish oil supplementation in pregnancy on breast milk fatty acid composition over the course of lactation: a randomized controlled trial. *Pediatr Res.* (2007) 62:689–94.
40. Ulven SM, Holven KB. Comparison of bioavailability of krill oil versus fish oil and health effect. *Vasc Health Risk Manag.* (2015) 11:511–24.
41. Moltó-Puigmartí C, Castellote AI, Carbonell-Estrany X, López-Sabater MC. Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clin Nutr.* (2011) 30:116–23.
42. Ecker J. The opposing effects of n–3 and n–6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* (2008) 47:147–55.
43. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol.* (2011) 44:203–15.
44. Bowen RAR, Clandinin MT. Maternal dietary 22 : 6n-3 is more effective than 18 : 3n-3 in increasing the 22 : 6n-3 content in phospholipids of glial cells from neonatal rat brain. *Br J Nutr.* (2005) 93:601–11.

45. Suh M, Wierzbicki AA, Lien EL, Clandinin MT. Dietary 20:4n-6 and 22:6n-3 modulates the profile of long- and very-long-chain fatty acids, rhodopsin content, and kinetics in developing photoreceptor cells. *Pediatr Res.* (2000) 48:524–30.
46. Robinson DT, Martin CR. Fatty acid requirements for the preterm infant. *Semin Fetal Neonatal Med.* (2017) 22:8–14.
47. Baack ML, Norris AW, Yao J, Colaizy T. Long-chain polyunsaturated fatty acid levels in US donor human milk: meeting the needs of premature infants? *J Perinatol.* (2012) 32:598–603. doi: 10.1038/jp.2011.152
48. Cimatti AG, Martini S, Munarini A, Zioutas M, Vitali F, Aceti A, Mantovani V, Faldella G, Corvaglia L. Maternal Supplementation With Krill Oil During Breastfeeding and Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LCPUFAs) Composition of Human Milk: A Feasibility Study. *Front Pediatr.* 2018 Dec 20;6:407.