

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**Utilizzo di algoritmi genetici nell'ambito della
bioingegneria: applicazione alla identificazione
di modelli cardiaci**

Elaborato in

LABORATORIO DI BIOINGEGNERIA L-A

Relatore:

Prof. Ing. Stefano Severi

Presentata da:

Carlo Gotti

Correlatore:

Dott.sa Chiara Bartolucci

Sessione II

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

INTRODUZIONE	1	
CAPITOLO 1 – Cenni Storici		
1.1	Introduzione	3
1.2	Lo slancio degli anni 60	6
1.3	Gli anni 70	7
	1.3.1 Evolution Strategies	8
	1.3.2 Evolutionary Programming	8
	1.3.3 Genetic Algorithms	8
1.4	Gli anni 80	9
1.5	L'unificazione degli anni 90	10
1.6	Nel nuovo millennio	11
CAPITOLO 2 – All'interno dell'algorithm		
2.1	Introduzione	13
2.2	Struttura di un algoritmo evolutivo	15
	2.2.1 Rappresentazione	16
	2.2.2 Valutazione	16
	2.2.3 Popolazione	17
	2.2.4 Selezione Parentale	17
	2.2.5 Variazione Genetica	18
	2.2.6 Sostituzione	19
	2.2.7 Esecuzione dell'algorithm	20
2.3	Algoritmi Genetici	24
	2.3.1 Rappresentazione	25
	2.3.1.1 Rappresentazione binaria	25
	2.3.1.2 Rappresentazione a numeri interi	25
	2.3.1.3 Rappresentazione reale a virgola mobile	25
	2.3.1.4 Rappresentazione per permutazioni	26
	2.3.2 Selezione Parentale	26
	2.3.2.1 Selezione proporzionale al fitness	26
	2.3.2.2 Selezione a torneo	27
	2.3.3 Mutazione	28
	2.3.3.1 Mutazioni per rappresentazioni binarie	28
	2.3.3.2 Mutazioni per rappresentazioni a numeri interi	28
	2.3.3.3 Mutazioni per rappresentazioni a numeri reali	29

2.3.3.4	Mutazioni per rappresentazioni a permutazioni	30
2.3.4	Ricombinazione/Crossover	31
2.3.4.1	Crossover per rappresentazioni binarie	32
2.3.4.2	Crossover per rappresentazioni a numeri interi	32
2.3.4.3	Crossover per rappresentazioni a numeri reali	33
2.3.4.4	Crossover per rappresentazioni a permutazioni	36
2.3.5	Sostituzione	39
2.3.5.1	Cancellazione totale	39
2.3.5.2	Basata su età	40
2.3.5.3	Basata sul fitness	40

CAPITOLO 3 – Panoramica sugli algoritmi genetici nella bioingegneria

3.1	Introduzione	41
3.2	Biomeccanica	41
3.3	Strumentazione Biomedica	42

CAPITOLO 4 – Ottimizzazione tramite algoritmi genetici nello studio dell'elettrofisiologia cardiaca

4.1	Potenziale d'azione	45
4.1.1	Aritmogenesi correlata al potenziale d'azione – alternans	48
4.2	Tecnologie di studio	49
4.2.1	Voltage Clamp	49
4.2.2	Current Clamp	51
4.2.3	Patch Clamp	51
4.2.4	Dynamic Clamp	53
4.3	Modelli Cardiaci	53
4.3.1	Modello Hodgkin-Huxley	53
4.3.2	Modello di Beeler Reuter	55
4.3.3	Modello di Luo-Rudy LR1	56
4.3.4	Modello di Nygren	56
4.4	Identificazione di modelli cardiaci del potenziale d'azione tramite algoritmo genetico	59
4.4.1	Primo obiettivo: studio di sensibilità del modello	60
4.4.2	Secondo obiettivo: Utilizzo di un algoritmo genetico per la riproduzione dei potenziali d'azione nominali affetti da alternans	63
4.5	Trasformazione in silico e in vitro del potenziale d'azione	68
4.5.1	Trasformazione inter-specie di modello tramite algoritmo genetico	69

4.5.2	Antropomorfizzazione di un cardiomiocita neonatale murino	72
	CONCLUSIONI	95
	BIBLIOGRAFIA	97

INTRODUZIONE

In questo studio sarà trattato lo sviluppo degli algoritmi genetici, uno strumento di calcolo nato ispirandosi alle leggi Darwiniane sull'evoluzione naturale. Questi algoritmi, le cui basi furono introdotte a partire dagli anni '40, mirano alla risoluzione di una vasta categoria di problemi computazionali utilizzando un approccio differente, basato sulle regole di mutazione e ricombinazione proprie della genetica. Essi permettono infatti di valutare delle soluzioni di partenza e, grazie alle variazioni introdotte dalla modifica casuale o dalla ricombinazione di queste, crearne di nuove nel tentativo di convergere verso soluzioni ottimali.

Questo studio si propone come una descrizione di questo strumento, dei suoi sviluppi e delle sue potenzialità in ambito bioingegneristico, focalizzandosi sul suo utilizzo recente nell' identificazione parametrica di modelli cardiaci.

Attraverso questi algoritmi verranno proposti dei metodi per l'identificazione parametrica di modelli di potenziale d'azione cardiaco affetti da alternans, un comune precursore di aritmie. La ricerca di questi parametri, rappresentati dalle più importanti conduttanze ioniche di membrana, si prefigge di aprire la strada verso possibili ulteriori sperimentazioni, al fine di elaborare preventivamente previsioni di queste condizioni patologiche.

Inoltre verrà presentato un metodo innovativo di trasformazione del potenziale d'azione cardiaco da quello caratteristico di una specie a quello di un'altra, attraverso l'utilizzo combinato di algoritmi genetici e di una particolare tecnica di voltage clamp chiamata *dynamic clamp*.

L'elaborato sarà strutturato in quattro capitoli, cercando di guidare il lettore prima attraverso la comprensione del concetto di algoritmo genetico, poi della sua implementazione specifica, per poi giungere con un'adeguata padronanza alle sperimentazioni specifiche in ambito di modellistica cardiaca.

Il **capitolo 1** si occuperà della spiegazione concettuale e del percorso storico che ha portato alla nascita degli algoritmi genetici, partendo dalle prime idee teoriche per poi giungere, con l'avvento su larga scala dei calcolatori elettronici, allo sviluppo

degli algoritmi evolutivi, un'ampia e varia famiglia accomunata dall'ispirazione alle teorie darwiniane dalla quale sono nati successivamente gli algoritmi genetici.

Il **capitolo 2** descriverà invece l'implementazione dell'algoritmo; una prima parte si occuperà della spiegazione dei componenti costitutivi di tutti gli algoritmi evolutivi per poi focalizzarsi, nella seconda parte, sugli operatori e sulle tecniche specifiche proprie degli algoritmi genetici.

Il **capitolo 3** fornirà, attraverso esempi tratti da ricerca bibliografica, una panoramica dei recenti utilizzi degli algoritmi genetici nelle diverse aree della bioingegneria.

Il **capitolo 4** si occuperà infine delle sperimentazioni nell'ambito della modellistica cardiaca svolte tramite l'utilizzo degli algoritmi genetici. Al fine di introdurre alcuni concetti chiave sul potenziale d'azione cardiaco, sulle patologie connesse ad esso e sui vari modelli sviluppati in passato (utili alla comprensione) questi verranno ripresi e brevemente spiegati nella prima parte del capitolo. La seconda parte tratterà invece alcune sperimentazioni nello specifico: verrà prima analizzata la sensibilità di un modello esistente (Luo Rudy - LR1) alle variazioni dei parametri di conduttanza ionica, poi si procederà alla identificazione parametrica di un modello di potenziale d'azione affetto da alternans tramite algoritmo genetico. Infine nell'ultima parte del capitolo si descriverà l'utilizzo del *cell-type transforming clamp* (CTC) per la trasformazione interspecie *in silico* e *in vitro* del potenziale d'azione cardiaco. Al termine delle sperimentazioni verranno spiegati i vantaggi ottenuti tramite questi nuovi approcci di studio, le loro potenzialità e le limitazioni.

CAPITOLO 1

Cenni storici

1.1 INTRODUZIONE

Il concetto di algoritmo genetico si basa sull'unione di due discipline che fino alla metà del secolo scorso raramente venivano accostate. In primo luogo occorre sottolineare come gli algoritmi genetici derivino da una classe più ampia detta algoritmi evolutivi. La prima idea di algoritmo affonda le sue radici nell'antica Persia dell'800 d.C. Il nome stesso che oggi si attribuisce deriva dal nome del famoso matematico che qui è nato, Al-Khwarizmi. La formalizzazione del concetto di algoritmo è stata problema e argomento di discussione fino al secolo scorso e tutt'oggi una sua definizione formale è una sfida aperta. È dall'inizio del novecento che tuttavia si è sviluppato un forte slancio nello studio degli algoritmi che li ha portati oggi a essere alla base dell'informatica moderna. Quando invece parliamo di evoluzione, il collegamento con Charles Darwin è immediato. Le sue teorie offrirono per la prima volta una spiegazione dell'intrinseco meccanismo della biodiversità; in quella che oggi chiamiamo una visione macroscopica dell'evoluzione, la selezione naturale gioca un ruolo centrale. Dato un ambiente che può ospitare solo un numero limitato di individui e l'innato istinto di questi alla riproduzione, la selezione diventa inevitabile per non far crescere esponenzialmente la popolazione. La selezione naturale favorisce quegli individui che competono con più efficienza per le date risorse; in altre parole, quelli che più si adattano alle condizioni ambientali. Questo fenomeno è anche conosciuto come “*survival of the fittest*”. L'altra forza primaria identificata da Darwin consiste nelle variazioni fenotipiche all'interno dei membri di una popolazione; questi tratti sono le caratteristiche fisiche e comportamentali di un individuo che interessano direttamente il suo adattamento all'ambiente. Ogni individuo rappresenta una combinazione unica di tratti fenotipici che vengono sistematicamente messi alla prova dall'ambiente naturale; se il risultato è positivo

queste caratteristiche vengono propagate attraverso le generazioni successive, altrimenti vengono scartate dalla morte degli individui senza la possibilità di riprodursi. L'intuizione di Darwin consistette in quelle piccole casuali variazioni o mutazioni nei tratti fenotipici che avvengono durante la riproduzione da generazione a generazione. Attraverso queste variazioni si sviluppano nuove combinazioni di tratti e vengono successivamente testate dall'ambiente: le migliori sopravvivono e si riproducono e così l'evoluzione prosegue. Le teorie Darwiniane furono portate avanti negli anni successivi alla sua morte da illustri scienziati, tra i quali possiamo ricordare Sewall Wright (1932), genetista statunitense degli anni 30. Secondo queste teorie gli organismi occupano picchi adattativi e per evolvere a picchi più alti, migliori, le specie devono prima passare attraverso una valle di stadi intermedi caratterizzati da un livello di adattamento peggiore. Questo processo può essere rappresentato con la metafora intuitiva dell'orizzonte adattativo (*Adaptive Landscape*). Su questo orizzonte la dimensione delle altezze corrisponde al fitness, in altre parole al grado di adattamento degli individui. Alitudini elevate corrispondono a ottimi valori di fitness. Le altre due (o più) dimensioni corrispondono invece ai vari tratti biologici, come vediamo in figura 1.1.

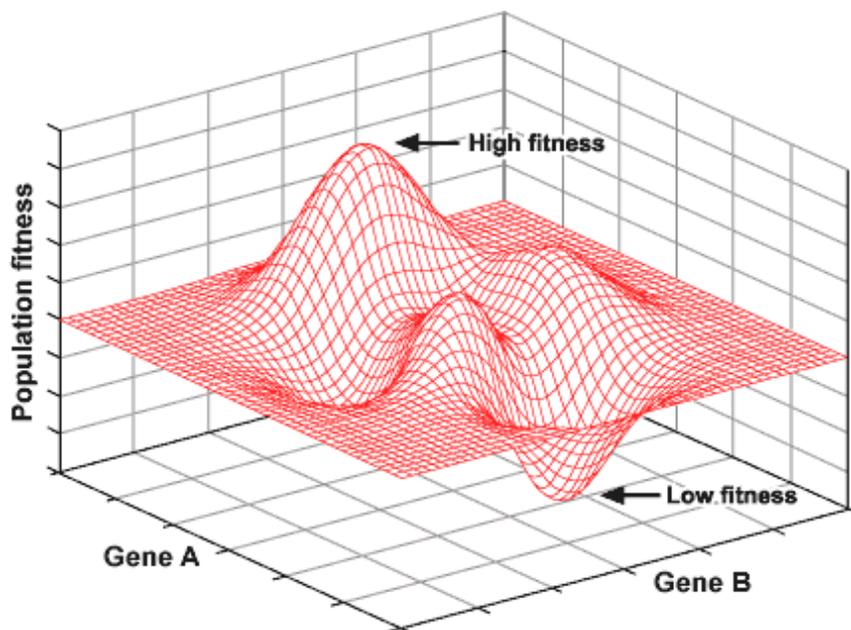


Figura 1.1: Adaptive Landscape [1]

Il piano X-Y rappresenta tutte le possibili combinazioni mentre sull'asse Z sono rappresentati i vari valori di fitness. Ogni picco rappresenta un range di individui con

tratti fenotipici ottimali. La popolazione data può essere rappresentata graficamente come un insieme di punti su questo orizzonte, dove ogni punto è un individuo che rappresenta una possibile combinazione di tratti fenotipici. Possiamo rappresentare quindi l'evoluzione come un processo di avanzamento graduale della popolazione ad aree ad elevata altitudine, questo grazie alle variazioni e alla selezione naturale. Come possiamo vedere sempre in figura, esistono più picchi possibili di altezze diverse, ognuno di essi rappresenta un buon risultato in termini di fitness rispetto alle zone adiacenti. Chiameremo il più alto, ovvero quello corrispondente al massimo valore di fitness, **ottimo globale**; i restanti picchi invece prendono il nome di **ottimi locali**.

Questo tipo di prospettiva porta in maniera piuttosto naturale alla concezione di sistema evolutivo come un processo di ottimizzazione, anche se l'evoluzione non può essere certo rappresentata dalla risalita unidirezionale di uno di questi picchi. Un'alternativa è rappresentata dalla visione del sistema evolutivo come un sistema complesso, adattativo, che cambia la sua configurazione e le sue risposte nel tempo in base alla dinamicità delle sue interazioni in un ambiente mutabile. L'idea che andava delineandosi era tanto intuitiva quanto complicata; come l'evoluzione naturale aveva portato all'ottimizzazione delle specie viventi, un algoritmo che ne imitasse le leggi e le dinamiche avrebbe presumibilmente potuto selezionare le soluzioni migliori una volta applicato a un determinato problema. Il concetto chiave è rappresentato proprio dal parallelismo con le teorie di Darwin: vi sono degli "individui", comunemente dei vettori di valori, che formano una popolazione. Da questa prima generazione l'algoritmo, tramite meccanismi analoghi alla pressione selettiva, individua gli elementi con fitness più elevato rispetto al dato problema per poi formare, in seguito a processi di riproduzione, mutazione e ricombinazione, la generazione successiva, modificata e presumibilmente migliore.

Affronteremo nel dettaglio questi meccanismi nel successivo capitolo; presenteremo di seguito una descrizione dei passaggi storici più significativi della nascita di questa disciplina.

I primi esempi accomunabili a questa visione li possiamo trovare in Friedman (1956) e nei suoi tentativi di sviluppo di circuiti di controllo evolutivi per robot. Anche il

tentativo di automatizzare la programmazione dei computer ha contribuito allo sviluppo di questa idea in quanto spesso si richiedeva l'implementazione di macchine "autodidatte" che evolvessero il loro set di istruzioni nel tempo (Friedberg,1959).

1.2 LO SLANCIO DEGLI ANNI 60

Come si evince dal precedente paragrafo, gli albori di queste teorie sono da ricercarsi già nella prima metà del novecento, ma come ogni teoria sono le condizioni esterne e ambientali a determinarne lo sviluppo. La chiave di volta nel nostro caso fu l'incredibile sviluppo dei calcolatori digitali negli anni 60. La disponibilità di queste macchine per università e laboratori crebbe esponenzialmente durante questi anni soprattutto grazie ad un costo sempre minore di queste ultime. Con questo nuovo strumento molti gruppi di ricerca furono attratti dall'idea di poter utilizzare questi algoritmi ispirati alla biologia come metodo risolutivo per i nuovi complessi problemi che venivano proposti alle nuove macchine. Durante questi anni si distinsero tre gruppi separati, anche geograficamente, ai quali oggi dobbiamo il maggiore contributo nella definizione di questi algoritmi. Uno di essi si forma all'Università di Berlino, dove Rechenberg e Schwefel sviluppano le loro idee riguardo all'utilizzo degli algoritmi evolutivi per risolvere dei complessi problemi di ottimizzazione parametrica a coefficienti reali. È da questo studio che successivamente si formerà una vera e propria famiglia di algoritmi chiamati "*Evolution Strategies*" tutt'oggi considerati tra i migliori strumenti per l'ottimizzazione di funzione. Separatamente, all'Università della California, Los Angeles, Lawrence Fogel, considerato un pioniere in questo campo, ipotizzò un nuovo utilizzo di queste tecniche evolutive per l'intelligenza artificiale. Fogel inizialmente utilizzò questi algoritmi per incrementare l'efficienza di alcune macchine a stati finiti (agenti) all'interno di un framework di tipo evolutivo chiamato "*Evolutionary Programming*". Successivamente e tuttora, questa famiglia di algoritmi si sono spinti ben oltre la semplice ottimizzazione di questo tipo di macchine. Il terzo gruppo si formò negli stessi anni all'Università del Michigan dove, quello che può essere considerato come il terzo padre degli algoritmi evolutivi, Holland, vide questi ultimi come potenti strumenti per poter implementare sistemi

adattativi particolarmente robusti e soprattutto capaci di confrontarsi con un ambiente variabile, con parametri incerti. Infatti, in questi anni era costante la ricerca di macchine capaci di “imparare”, o quantomeno di variare il loro comportamento in base alle diverse situazioni. Nonostante questi algoritmi evolutivi fossero nati prendendo spunto direttamente dalla biologia, in poco tempo venne abbandonata l’idea di riprodurre il “funzionamento” dell’evoluzione naturale attraverso l’uso dei calcolatori. L’interesse si spostò invece sull’imitazione di alcuni aspetti chiave ritenuti rilevanti per il loro funzionamento. Conseguentemente, ancora oggi spesso vengono sacrificati in questi algoritmi alcuni aspetti che sono di fondamentale importanza nell’equivalente naturale: le popolazioni di individui presentano spesso dimensioni fissate o limitate, riproduzioni asessuate, accoppiamenti totalmente casuali o prole che diviene immediatamente adulta. Tutte queste caratteristiche sono fondamentali per l’evoluzione naturale mentre negli algoritmi sono semplificazioni che talvolta si possono rivelare tanto necessarie quanto utili. A livello computazionale infatti certe limitazioni sono state introdotte per limitare la complessità del calcolo e di conseguenza il tempo impiegato nell’elaborazione. Queste restrizioni, soprattutto nei primi anni di sviluppo degli algoritmi evolutivi, hanno spesso portato a deviazioni consistenti dei risultati attesi inizialmente, compromettendo talvolta i risultati.

1.3 GLI ANNI 70

La ricerca si è spostata nel decennio successivo avendo come bagaglio tante promettenti idee e teorie ma una visione d’insieme del progetto più sfocata che definita. Le due principali problematiche rimaste senza risposta dal decennio precedente consistevano in: una corretta caratterizzazione del comportamento di questi sistemi implementabili; la comprensione delle potenzialità dei suddetti e come si sarebbero potuti usare per la risoluzione di problemi. Il lavoro di questa decade si concentrò soprattutto sullo sviluppo e sull’implementazione dei metodi che si erano già distinti negli anni 60. Precisamente, i progetti portati avanti dai tre gruppi menzionati precedentemente, determinarono una vera e propria netta divisione degli

algoritmi evolutivi in tre famiglie diverse: “*evolution strategies*”, “*evolutionary programming*” e “*genetic algorithms*”.

- *1.3.1 EVOLUTION STRATEGIES (ES)*

Il lavoro nato dalle ricerche di Rechemberg e Schwefel si concentrò sull’ottimizzazione del calcolo delle funzioni a valori reali. La caratteristica peculiare di questi algoritmi consiste nell’auto-adattamento dei parametri strategici. A differenza degli altri, in questi algoritmi non variano solo gli individui ma anche i parametri che regolano le mutazioni. In questo modo gli stessi operatori di mutazione coevolvono nel tempo, invece di essere predeterminati. Questa tecnica, ancora oggi ampiamente utilizzata, fornisce risultati estremamente performanti nello studio di ottimizzazione di funzioni a parametri reali.

- *1.3.2 EVOLUTIONARY PROGRAMMING (EP):*

Come precedentemente detto, l’*evolutionary programming* è stata inizialmente sviluppata per simulare l’evoluzione come un processo di apprendimento con lo scopo di implementare l’intelligenza artificiale. Quest’ultima può essere definita come la capacità di un sistema di adattare il proprio comportamento al fine di migliorarsi con le mutevoli situazioni ambientali. Prerequisito per ritenere un sistema “intelligente” è stata ritenuta la capacità di prevedere i cambiamenti ambientali di funzionamento.

In questa famiglia di algoritmi gli individui sottoposti ad evoluzione consistevano in macchine a stati finiti, di conseguenza le mutazioni si traducevano nell’aggiunta, modifica o eliminazione degli archi, mentre la ricombinazione consisteva nella combinazione di porzioni di due macchine a stati finiti a formarne una nuova.

- *1.3.3 GENETIC ALGORITHMS (GA):*

Gli algoritmi genetici, sui quali si focalizzerà questa pubblicazione, vennero inizialmente sviluppati come relativamente indipendenti dall’applicazione sulla quale sarebbero dovuti essere utilizzati. Occorre ricordare che la nascita di questi algoritmi è storicamente attribuita al già citato John Henry Holland con la pubblicazione nel

1975 del libro “*Adaptation in Natural and Artificial System*”, tuttora considerato una pietra miliare della intera disciplina.



Figura 1.2: John H. Holland [2]

1.4 GLI ANNI 80

Gli anni 70 ci lasciavano in eredità una vasta collezione di algoritmi evoluti al punto da esibire spesso performance notevoli quando applicati a certi problemi per i quali erano stati scritti. Ovviamente il passo successivo consisteva nell'utilizzare questo background per svilupparne di altrettanto efficienti e di nuovi, in grado di affrontare problematiche diverse. La più comune applicazione sulla quale si era concentrata la ricerca in generale degli algoritmi evolutivi era probabilmente l'ottimizzazione.

Nel caso delle *Evolution Strategies* (ES) si presentarono numerose difficoltà nell'affrontare problemi di dimensione molto elevata e varie modifiche furono apportate. Allo stesso modo, tentando di applicare gli algoritmi genetici a una serie sempre più vasta di problemi, emersero varie difficoltà. Frequentemente questi algoritmi individuavano rapidamente la regione nella quale esisteva un massimo globale ma da questo punto non convergevano al valore ottimale altrettanto velocemente. Vennero proposte varie soluzioni, ricordiamo i contributi di Goldberg e Whitley, come ad esempio l'utilizzo di metodi di selezione alternativi, che vedremo in seguito, quali la selezione a torneo. Altri contributi che migliorarono questi

algoritmi incrementandone le performance furono ad esempio l'introduzione delle tecniche elitariste, sulle quali ci soffermeremo in seguito, per il trattamento dei migliori e peggiori individui della generazione introdotte da De Jong e Whitley. In questo periodo la comunità scientifica non si concentrò solamente sulle tecniche di selezione o sulla elaborazione dei dati da parte degli algoritmi, ma anche sulla vera e propria “natura” di questi dati. Vennero proposte anche rappresentazioni alternative per gli individui. Fino a questo momento la procedura standard consisteva in una rappresentazione basata su vettori di valori binari. Divenne evidente come piccole mutazioni numeriche su questi valori binari potessero corrispondere a grandi mutazioni del fenotipo (lo switch di un solo valore, tra 0 e 1, nella parte sinistra del numero binario corrisponde una variazione numerica anche molto consistente). Questo portò all'introduzione di tecniche di rappresentazioni alternative come i codici Gray oppure veri e propri vettori rappresentati da valori reali.

Come già prima citato, la ricerca non si concentrò solo sull'incremento della performance degli ottimizzatori, ma anche sull'applicabilità di questi algoritmi a nuovi tipi di problemi. Vennero sviluppati dei sistemi classificatori (Holland, 1986; Brooker, 1982) come semplici modelli di cognizione utilizzando algoritmi genetici come motori chiave per l'apprendimento e l'adattamento del classificatore stesso. Videro la luce anche i primi tentativi di applicazioni biomediche, come lo sviluppo di reti neurali (Harp et al., 1989; de Garis, 1990).

Divenne evidente con il passare degli anni come la “filosofia” di ricerca non fosse più mirata alla riproduzione di un fenomeno naturale quale l'evoluzione; questo distacco si concretizzò nella sua interezza sul finire degli anni 80. Gli algoritmi ormai imitavano l'evoluzione solo negli aspetti chiave utili al fine del calcolo mentre quelli che lo avrebbero rallentato vennero appositamente sacrificati.

1.5 L'UNIFICAZIONE DEGLI ANNI 90

I risultati finora ottenuti dai tre principali gruppi sugli algoritmi evolutivi derivavano da un lavoro indipendente di ognuno di essi; le interazioni tra di essi non erano frequenti. Con l'emergere di alcune importanti conferenze focalizzate sugli algoritmi

evolutivi durante i primi anni 90 per la prima volta si verificò un vero e proprio scambio di idee e di approcci, come mai avvenuto prima. Ognuno dei gruppi, dopo un ventennio di ricerca, aveva ormai consolidato il proprio lavoro e le proprie teorie; il confronto fu quindi di estrema utilità riuscendo ad elaborare e meglio comprendere le somiglianze e le differenze degli approcci, convenendo nella necessità di adottare una visione unificata per tutti gli algoritmi evolutivi. Uno dei primi risultati di questi incontri fu la scelta del nome “Evolutionary Computation” come denominazione comune che abbracciasse la ricerca di tutti e tre i gruppi e la conseguente creazione della omonima prima rivista di divulgazione scientifica del settore.

L'intreccio di idee durante questi incontri portò ovviamente a miglorie in ognuna delle differenti teorie, che potevano ora beneficiare della conoscenza dei punti di forza delle altre. Le conseguenze non si limitarono a singoli miglioramenti ma emerse in breve tempo la necessità di rivisitare molte delle assunzioni e delle teorie di base di ogni gruppo per convergere in una visione comune rafforzata e generalizzata del concetto di algoritmo evolutivo. Tutto questo si tradusse nella nascita di un workshop, il FOGA, che determinò un nuovo slancio e una vera e propria rinascita di questo settore.

Tra i vari contributi di questo decennio possiamo annoverare il lavoro dell'informatico statunitense John Koza che nel 1992 “inventò la programmazione genetica, una particolare tecnica di apprendimento automatico che usa un algoritmo evolutivo per ottimizzare una popolazione di programmi di computer secondo un paesaggio adattativo determinato dall'abilità del programma di arrivare ad un risultato computazionalmente valido (ovvero di saper svolgere il compito dato)”[3].

Nel 1995 invece Stewart Wilson reinventò i sistemi classificatori dell'intelligenza artificiale rendendoli capaci di apprendere attraverso le tecniche degli algoritmi genetici.

Infine possiamo ricordare Manuel Lozano e Francisco Herrera che in ricerche congiunte hanno contribuito, con un'ampia rassegna di operatori genetici, ad una migliore e consolidata forma di rappresentazione per gli algoritmi genetici in domini continui attraverso l'utilizzo di numeri reali.

1.6 NEL NUOVO MILLENNIO

Dopo quarant'anni di storia e con la ritrovata unificazione, nonostante si fosse raggiunta un'adeguata maturazione nell'ambito di questa disciplina, le ricerche continuarono affrontando problematiche sempre più complesse. Questo portò a una vasta estensione nell'utilizzo degli algoritmi evolutivi in diversi settori scientifici. Gli studi di bioingegneria comprendenti algoritmi genetici che saranno analizzati in questo lavoro si collocano proprio nel nuovo millennio.

La comunità conta, dalla fine degli anni '90, sul supporto di diverse riviste di divulgazione scientifica come:

- *Evolutionary Computation*
- *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*
- *Genetic Programming and Evolving Machines*

e su molteplici conferenze tra le quali ricordiamo:

- *GECCO: Genetic and Evolutionary Computation Conference*
- *CEC: Congress on Evolutionary Computation*
- *PPSN: Parallel Problem Solving from Nature*
- *FOGA: Foundation of Genetic Algorithms*

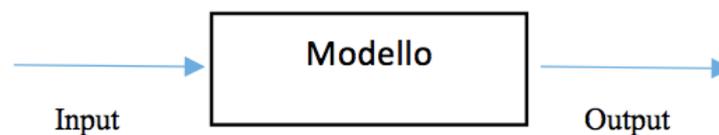
CAPITOLO 2

All'interno dell'algoritmo

2.1 INTRODUZIONE

Nel presente capitolo verranno illustrate nel dettaglio le caratteristiche e potenzialità degli algoritmi evolutivi, ed in particolar modo di quelli genetici, utilizzati nel “*problem solving*” di una vasta area di applicazioni.

Un generico sistema di calcolo può essere schematicamente rappresentato da tre componenti principali: uno o più input, gli output e il modello interno che li connette.



Con questa semplice rappresentazione si possono distinguere tre tipi di problemi comunemente affrontati nelle varie applicazioni; la principale caratteristica che contraddistingue l'appartenenza ad una o all'altra tipologia è rappresentata da quale dei tre componenti non è determinato o conosciuto a priori. Nei problemi di **identificazione** non si conosce l'implementazione del modello mentre sia i dati in input che quelli in output sono conosciuti. L'obiettivo di questo tipo di problema consiste nel caratterizzare un adeguato modello che permetta l'interconnessione dei dati di ingresso e di uscita. Un'altra tipologia molto comune è rappresentata dai problemi di **ottimizzazione**, ove si conoscono sia il modello sia gli output; in questo caso la richiesta consiste nell'individuare adeguati input che producono gli output assegnati. Come ultima tipologia troviamo i problemi cosiddetti di **simulazione**; come il nome stesso suggerisce attraverso la conoscenza di alcuni input e della implementazione del modello si richiede il calcolo dei relativi output.

Lo sviluppo di “problem solvers” automatizzati è stato uno dei temi centrali della matematica e dell'informatica; gli algoritmi evolutivi si prefiggono gli stessi obiettivi utilizzando un approccio direttamente ispirato alla teoria dell'evoluzione. Come già

citato nel precedente capitolo occorre ricordare che la seguente descrizione sarà tratta dalla rielaborazione teorica della disciplina avvenuta successivamente all'unificazione dei tre maggiori gruppi di sviluppo a partire dagli anni 90.

Alla base di questa variegata famiglia di algoritmi si possono trovare alcuni aspetti chiave comuni: una popolazione data costituita da individui, una pressione competitiva che determina selezione naturale e una conseguente ottimizzazione o crescita in termini di fitness della popolazione. Le due forze fondamentali che governano questo processo sono rappresentate dagli operatori di variazione e dalla successiva selezione; i primi possono essere identificati nella ricombinazione e nella mutazione e garantiscono la necessaria variabilità tra gli individui, la seconda rappresenta una vera propria forza di pressione che tende a selezionare gli individui più competitivi. Per queste caratteristiche di comportamento è intuitivo (ma non sempre corretto) vedere questi algoritmi come processi di ottimizzazione: il fitness degli individui in questo caso non rappresenta altro che la nostra funzione costo da ottimizzare. Un altro punto di vista può invece descrivere l'evoluzione, e quindi questi algoritmi, come un processo di adattamento; non tanto un'ottimizzazione quanto un tentativo di assecondare nel modo più efficiente possibile i requisiti dettati dall'ambiente.

Occorre sottolineare come varie componenti di questi algoritmi seguano regole di tipo stocastico, infatti per quanto ad esempio la possibilità di essere selezionati per le generazioni successive dipenda dal proprio valore di fitness, vi è sempre anche una minima possibilità che qualunque individuo possa avere successo riproduttivo. Anche le mutazioni, sebbene spesso all'interno di intervalli prefissati, sono governate da variazioni casuali. In figura 2.1 è possibile osservare una rappresentazione generale dell'algoritmo evolutivo attraverso uno schema a blocchi.

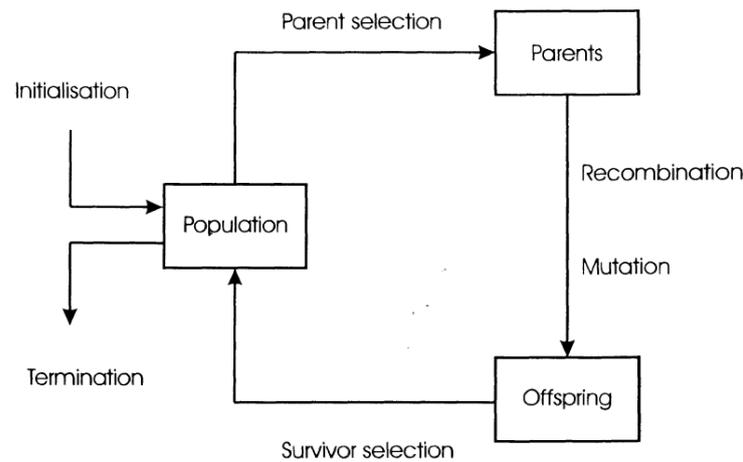


Figura 2.1: Generico schema a blocchi di un algoritmo evolutivo. La valutazione avviene all'interno del blocco della popolazione[1]

2.2 STRUTTURA DI UN ALGORITMO EVOLUTIVO:

Come precedentemente illustrato, i vari gruppi di lavoro che agirono separatamente dagli anni 70 agli anni 90 differivano soprattutto nelle metodologie di rappresentazione degli individui della popolazione mentre presentavano caratteristiche largamente condivise in gran parte della struttura dei propri algoritmi. Da figura 2.1 si può osservare come queste componenti comuni possano essere riassunte in:

- Rappresentazione
- Valutazione
- Popolazione
- Selezione
- Variazione genetica (Mutazione e Ricombinazione)
- Sostituzione (Selezione sopravvissuti)

Di seguito verranno descritti e spiegati i componenti fondamentali comuni all'intera famiglia degli algoritmi evolutivi per poi soffermarsi, nella seconda parte del capitolo, sulle specifiche tecniche di calcolo utilizzate in particolare dalla famiglia più nota e oggetto del nostro lavoro, gli algoritmi genetici.

2.2.1 RAPPRESENTAZIONE

La rappresentazione, detta anche definizione, costituisce il collegamento diretto tra l'algoritmo e il problema reale che viene affrontato. Ogni individuo appartenente alla popolazione come già detto può essere indicato come fenotipo; esso non è altro che la manifestazione esteriore di ciò che è codificato nel rispettivo genotipo. La rappresentazione si occupa proprio di questo collegamento ovvero del descrivere i tratti caratteristici fenotipici che dovranno essere sottoposti all' algoritmo utilizzando un set di valori che vanno a costituire lo spazio genotipico (ad esempio numeri reali, binari, interi ecc.). Il concetto è lo stesso che regola le leggi della genetica, i tratti caratteristici che si interfacciano con l'ambiente costituiscono il nostro fenotipo, il quale a sua volta non è altro che l'espressione diretta del nostro corredo genetico. Come in natura, anche negli algoritmi il meccanismo evolutivo agisce a livello del genotipo; occorre inoltre ricordare che "l'alfabeto" che costituisce questi due spazi, quello fenotipico e quello genotipico, spesso è molto differente.

Il termine "rappresentazione" inoltre può essere utilizzato con due significati principali: codifica, in quanto l'intero processo può essere visto come una mappatura del livello fenotipico per creare quello genotipico; oppure semplicemente come "struttura dei dati".

2.2.2 VALUTAZIONE

La funzione di valutazione esprime a livello matematico i requisiti di adattamento che ogni individuo dovrà soddisfare. È alla base dell'intero algoritmo in quanto sia la selezione sia la sostituzione, sia in generale l'intera pressione selettiva derivano da essa. In forma numerica è costituita da una funzione matematica che assegna una misura della qualità dei differenti genotipi. Nell'Evolutionary Computation questa assume frequentemente il nome di funzione di *fitness* mentre, più specificatamente, nei problemi inerenti a un'ottimizzazione spesso si parla di *objective function*, ovvero funzione costo, la quale può essere identica o una semplice trasformazione della funzione di fitness.

2.2.3 POPOLAZIONE

La popolazione rappresenta il vero proprio bacino, le fondamenta sulla quale agiscono gli algoritmi. Essa è costituita dall'insieme di tutti gli individui, quindi dei genotipi. Al contrario dell'equivalente naturale ove la dimensione della popolazione è dinamica e spesso è un parametro cardine che regola la pressione selettiva, negli algoritmi si è optato per la stragrande maggioranza dei casi per popolazioni di dimensioni fissate. Occorre sottolineare che è proprio la popolazione, e non gli individui, il soggetto principale dell'evoluzione: essa si modifica, evolve, migliora il fitness dei propri genotipi, migra verso massimi locali o globali; al contrario gli individui sono entità statiche che nascono e muoiono con determinate caratteristiche senza modificarle in alcun modo durante la propria esistenza.

2.2.4 SELEZIONE PARENTALE

La selezione all'interno della popolazione si riferisce alla scelta, basata su parametri di fitness, degli individui che diventeranno genitori e attraverso la riproduzione daranno vita a una nuova generazione. Questa impone il meccanismo di sopravvivenza del più forte tra gli individui; l'idea principale di selezione è rappresentata infatti dal preferire soluzioni di qualità elevata rispetto ad alternative peggiori: gli individui ritenuti migliori, con valori di fitness più elevati, avranno maggiori possibilità di successo riproduttivo. Occorre precisare che anche gli individui ritenuti non adatti avranno una possibilità ridotta, ma non nulla, di contribuire alla formazione della generazione successiva; questo perché è altresì importante che la popolazione conservi una sufficiente eterogeneità, non sappiamo infatti se un individuo ritenuto poco adatto in una generazione non possa, combinandosi con un individuo diverso, formarne uno totalmente nuovo e possibilmente migliore di tutti gli altri. A livello matematico questa caratteristica fornisce alcune garanzie per impedire che l'algoritmo concentri la popolazione e si blocchi attorno ad un minimo locale; senza questi accorgimenti gli individui

diverrebbero sempre più simili tra loro e si perderebbe la possibilità di esplorare l'intero spazio dei parametri in cerca dell'ottimo globale.

2.2.5 VARIAZIONE GENETICA

Gli operatori di variazione corrispondono in maniera diretta a quelli presenti nell'ambiente naturale: mutazione e ricombinazione. Il compito di questi è quello di generare nuovi individui, diversi, a partire dai genitori.

- **Mutazione**: è un operatore di variazione; quando viene applicato a un genotipo ne modifica un valore formando un nuovo individuo differente da quello di partenza. Quest' operatore si definisce: unario, in quanto agisce su un singolo individuo per produrne uno differente; stocastico, data la natura casuale di queste variazioni. Il suo utilizzo è di grande importanza per garantire la connessione dello spazio dei parametri; infatti gli algoritmi lavorano sull' assunzione che, dopo un periodo di tempo non stabilito, questi convergeranno su un ottimo globale. La possibilità che in un tempo finito questo avvenga è garantita dalla capacità dell'algoritmo di esplorare, teoricamente, ogni possibile candidato alla soluzione; la mutazione infatti permette di “saltare” da un punto all'altro di questo spazio senza una logica prestabilita. Quest'operatore presenta il suo equivalente anche nell' evoluzione naturale: le teorie oggi comunemente accettate propongono le mutazioni genetiche come causa scatenante della diversificazione degli esseri viventi: queste possono essere dovute a errori nei processi che si attuano sul materiale genetico o a interventi esterni, come patologie o radiazioni.
- **Ricombinazione**: il principio alla base di questo operatore è lo stesso che troviamo in natura: due individui con caratteristiche desiderabili ai fini evolutivi, attraverso la riproduzione, formano uno o più nuovi individui che presentano caratteristiche combinate dei genitori. In genetica l'equivalente è la fusione tra due gameti (sperma e ovulo) nella formazione dello zigote; i gameti a loro volta si formano grazie al processo di meiosi durante il quale una cellula eucariote con corredo cromosomico diploide origina quattro cellule con corredo aploide, dimezzato. Negli algoritmi il funzionamento è lo stesso. Porzioni differenti delle

informazioni che costituiscono gli individui selezionati come genitori (quindi con un buon valore di fitness) vengono trasmesse alla prole in modo combinato. In questo modo vi è un'alta probabilità (non la certezza) che il nuovo individuo generato presenti un miglioramento rispetto all'uno e all'altro genitore. La storia della vita sulla terra indica chiaramente come le precedenti assunzioni siano ampiamente dimostrate.

Questo tipo di operatore, chiamato anche *crossover*, è di tipo binario in quanto utilizza le informazioni di due genitori per la formazione di un figlio; è anch'esso stocastico vista la casualità nella scelta di quali tratti della prole provengono da un genitore e quali dall'altro ed è anche probabilistico, infatti viene solitamente determinata anche una certa possibilità di non venirvi sottoposti. Quest'operatore viene utilizzato diversamente a seconda della famiglia di algoritmi evolutivi: nell'*evolutionary programming* non viene mai usato mentre negli algoritmi genetici rappresenta l'operatore di ricerca principale.

2.2.6 SOSTITUZIONE

La sostituzione rappresenta la seconda tipologia di selezione che avviene sulla popolazione; questa ha luogo dopo che i processi di selezione parentale, mutazione, crossover hanno creato una momentanea popolazione più numerosa della precedente. Siccome, come già asserito, negli algoritmi la popolazione viene mantenuta a una cardinalità costante, occorre selezionare dei meccanismi per stabilire quali individui sopravvivranno andando a formare la generazione successiva e quali periranno. Solitamente queste scelte si basano o sulla selezione degli individui con migliore fitness o sul concetto di età oppure su entrambe. La sostituzione, detta appunto anche selezione dei sopravvissuti è prettamente deterministica, in quanto non presenta meccanismi stocastici come la mutazione e la ricombinazione.

2.2.7 ESECUZIONE DELL'ALGORITMO

La prima fase dell'esecuzione di un algoritmo evolutivo consiste nell'**inizializzazione** ovvero nella determinazione della prima popolazione. Nella maggior parte dei casi questa viene tenuta in modo casuale distribuendo la scelta dei genotipi stocasticamente sull'intero spazio dei parametri; esistono anche altre tipologie di scelta iniziale più mirate che illustreremo in seguito.

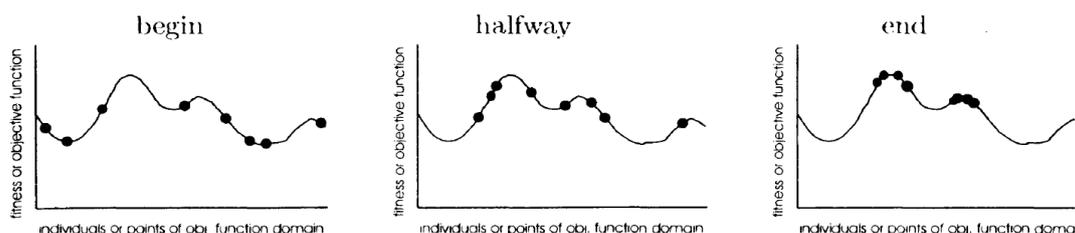


Figura 2.2: Tipico progresso di un algoritmo evolutivo in funzione della distribuzione della popolazione [1]

In figura 2.2 si può osservare il tipico progresso di un algoritmo evolutivo in funzione della distribuzione della sua popolazione: nella prima fase, quella immediatamente successiva all' inizializzazione, si nota come gli individui (rappresentati dai punti) siano distribuiti casualmente. Già dopo poche generazioni grazie alle variazioni genetiche introdotte dalla mutazione e dalla ricombinazione si vede come la popolazione si sia concentrata in zone caratterizzate da fitness più elevata lasciando invece le regioni più basse e meno ottimali. Nel terzo riquadro la popolazione è ormai costituita da individui appartenenti alle regioni più alte, ha quindi risalito i picchi raggiungendo i livelli di fitness più elevati. Ovviamente non è garantito che la popolazione si concentri sul picco più elevato ovvero l'ottimo globale; come già detto fenomeni di concentrazione attorno ad un ottimo locale sono possibili e devono essere evitati con opportune precauzioni. Una delle possibili cause è la prematura convergenza della popolazione attorno ad un picco; la conseguente perdita di variabilità nella popolazione rende successivamente difficile abbandonare questa regione per esplorarne di nuove e conseguentemente trovare un ottimo globale.

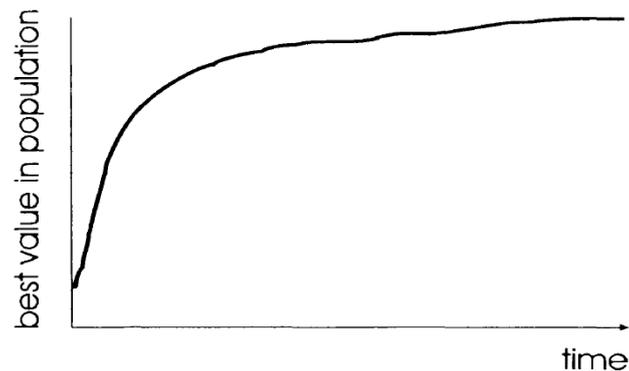


Figura 2.3: Tipico progresso di un algoritmo evolutivo in funzione della ricerca del miglior individuo e del tempo trascorso [1]

In figura 2.3 è invece illustrato il tipico progresso di un algoritmo evolutivo in termini del migliore individuo della popolazione trovato rispetto al tempo di elaborazione. Questa curva è comune a tutte le famiglie degli algoritmi evolutivi e presenta la caratteristica crescita ripida iniziale seguita da un plateau con crescita minore nel tempo. In un grafico come questo si evince il livello di ottimizzazione ottenuto nel caso si decidesse di interrompere l'elaborazione in un determinato momento, chiaramente ottenendo soluzioni sub-ottimali. Come precedentemente detto è possibile anche applicare dei criteri aggiuntivi per inizializzare l'algoritmo con una popolazione più mirata al risultato da conseguire; chiaramente questo comporta un costo in termini di elaborazione e, come illustrato in figura 2.4, questo procedimento spesso non porta reali vantaggi.

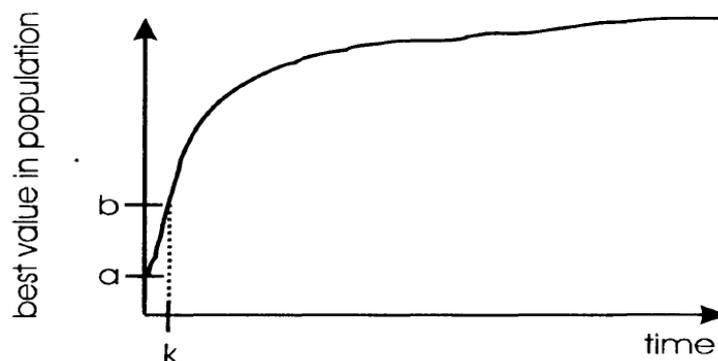


Figura 2.4: Spesso il calcolo di criteri aggiuntivi per inizializzare l'algoritmo non porta reali vantaggi: il livello *a* corrisponde al fitness del miglior individuo in una popolazione generata casualmente, *b* all'equivalente utilizzando criteri aggiuntivi. [1]

È possibile infatti vedere come le migliorie introdotte dall' inizializzazione ottimizzata possano essere uguagliate nel giro di poche generazioni da un algoritmo con popolazione iniziale generata stocasticamente. Sebbene in figura 2.3 fosse già evidente come il progresso dell'algoritmo in termini di fitness si ottenesse per la maggior parte nella prima metà dell'elaborazione rispetto alla seconda, si vuole rimarcare in figura 2.5 come solitamente non sia consigliabile prolungare l'esecuzione dell'algoritmo per lunghi periodi in quanto dopo un adeguato tempo di esecuzione il costo in termini di esecuzione non controbilancia gli effettivi miglioramenti in termini di fitness.

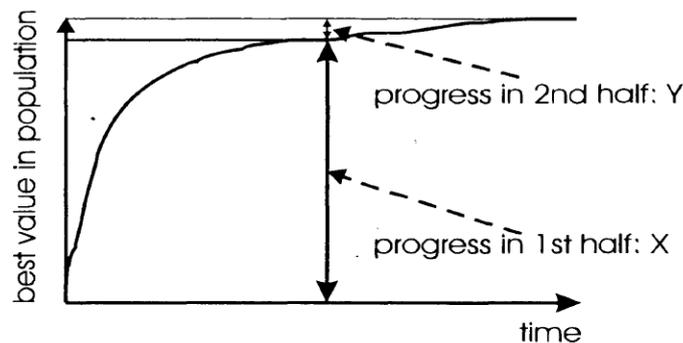


Figura 2.5: Dimostrazione di come elaborazioni troppo lunghe non portino a significativi miglioramenti di performance. X rappresenta il miglioramento in termini di fitness nella prima metà dell'esecuzione, Y il miglioramento ottenuto nella seconda [1]

Gli algoritmi evolutivi si sono dimostrati uno strumento non solo potente ma anche facilmente scalabile, in grado cioè di affrontare una vasta tipologia di problemi. Un confronto tra questi e altri algoritmi è presentato in figura 2.6: il grafico è rappresentato rispetto alle performance di esecuzione e al range dei possibili problemi risolvibili.

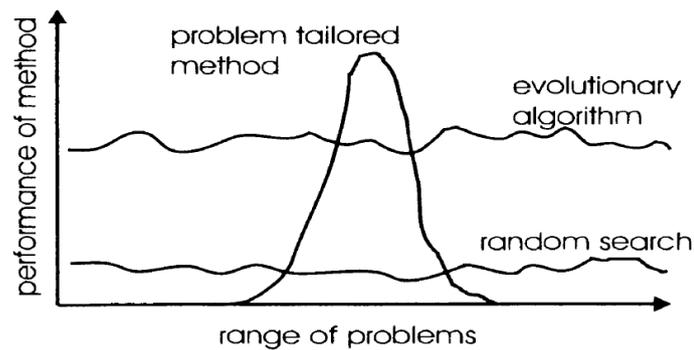


Figura 2.6: Visione degli anni 80 delle performance degli algoritmi evolutivi dopo Goldberg [1]

Risultano evidenti e schiacciati i miglioramenti ottenuti rispetto ad un algoritmo a ricerca casuale, anch'esso applicabile a una larga scala di problemi. La maggior differenza è evidenziabile rispetto ad algoritmi creati specificatamente per il problema oggetto di investigazione: chiaramente quest'ultimo presenta livelli di performance massimi maggiori di ogni altro algoritmo essendo stato scritto appositamente per il determinato problema, d'altra parte il livello di scalabilità è estremamente ridotto. Quanto detto chiarisce le motivazioni per le quali gli algoritmi evolutivi rappresentano un ottimo strumento di tipo quasi universale.

Le **condizioni di terminazioni** sono fondamentali per stabilire quando l'elaborazione dell'algoritmo dovrà terminare. Come condizione ovvia è immediato pensare al raggiungimento dell'ottimo globale; occorre considerare che questi algoritmi sono stocastici e non vi sono garanzie di raggiungere questo livello in un tempo finito. Occorre quindi determinare dei parametri al raggiungimento dei quali avremo la certezza di un arresto dell'elaborazione. Le opzioni più comuni generalmente sono:

- Massimo tempo della CPU utilizzato
- Numero totale di valutazioni di fitness raggiunto
- Mancanza di sufficienti incrementi in termini di fitness della popolazione in un dato periodo di tempo
- La variabilità/diversità della popolazione scende al di sotto di una determinata soglia.

Talvolta vengono utilizzate delle combinazioni delle precedenti come condizioni di terminazioni. È comunque necessario garantire che in qualunque caso l'algoritmo possa raggiungere la terminazione.

2.3 ALGORITMI GENETICI

Quanto scritto fino ad ora nel presente capitolo rappresenta una descrizione delle caratteristiche fondamentali degli algoritmi evolutivi. Ovviamente queste sono alla base anche degli algoritmi genetici, la famiglia che più si è sviluppata nel corso degli anni. Nella restante parte del capitolo verranno descritte tecnicamente le caratteristiche e gli operatori propri a questo gruppo partendo da una breve introduzione che ne definisce la terminologia principale [2]: “Gli algoritmi genetici codificano le variabili di un problema in stringhe di lunghezza finita appartenenti ad un alfabeto di una certa cardinalità. Le stringhe, che rappresentano le soluzioni candidate per il nostro problema sono chiamate cromosomi, gli alfabeti geni e i valori di questi geni sono chiamati alleli. A differenza delle tradizionali tecniche di ottimizzazione, gli algoritmi genetici lavorano con la codifica dei parametri piuttosto che con i parametri stessi. Per evolvere a soluzioni ottimali e per implementare la selezione naturale necessitiamo di una misura per distinguere le buone e le cattive soluzioni. La misura potrebbe essere una funzione costo che rappresenti un modello matematico o una simulazione computerizzata, oppure potrebbe essere una funzione soggettiva, dove sono gli essere umani a scegliere le migliori soluzioni rispetto alle peggiori. In sostanza la misura del fitness deve determinare la qualità della soluzione la quale sarà successivamente usata dall'algoritmo genetico per guidare l'evoluzione ad altre soluzioni ottimali. Un altro importante concetto dell'algoritmo genetico è la nozione di popolazione. A differenza dei tradizionali metodi di ricerca gli algoritmi genetici si basano su una popolazione di soluzioni candidate. La dimensione della popolazione, che tipicamente è specificata dall'utente, è uno dei fattori più importanti che determinano la scalabilità e la performance dell'algoritmo genetico.”

Utilizzando la suddivisione in componenti vista precedentemente verranno ora presentate le principali tecniche di funzionamento di questi algoritmi.

2.3.1 RAPPRESENTAZIONE

In questi algoritmi la scelta della rappresentazione o della mappatura del genotipo è di fondamentale importanza; una scelta corretta può determinare o meno l'efficienza di un algoritmo. Seguiranno ora le descrizioni delle rappresentazioni principali o quelle più comunemente usate: quella binaria, quella a interi, quella a numeri reali a virgola mobile e quella a permutazioni.

2.3.1.1 Rappresentazione binaria: rappresenta il caso più semplice e una delle prime ad essere utilizzata. Come il nome suggerisce il genotipo consiste in una stringa di valori binari. Utilizzando questa rappresentazione e nella scelta adeguata della lunghezza della stringa, occorre assicurarsi che ogni tipo di soluzione possa essere rappresentata e che al contrario ogni mutazione o ricombinazione sulla stringa produca una soluzione compatibile con la rappresentazione. Questo metodo offre l'immediato vantaggio di un calcolo facilitato per un elaboratore, tuttavia come anticipato nel precedente capitolo si presenta il problema delle differenze di significato dei vari bit all'interno di un numero binario: ad esempio partendo da una rappresentazione del numero 7 in codice binario (0111) non vi sono eguali probabilità che una mutazione di questo numero porti ad ottenere un "6" (0110) o un "8" (1000). Chiaramente nel primo caso occorrerebbe la sola modifica di un bit, nel secondo caso di tutti e 4.

2.3.1.2 Rappresentazione a numeri interi: un problema può presentare individui che possono essere meglio rappresentati da una stringa di numeri interi, ad esempio quando si è a conoscenza che i vari geni possono assumere un valore appartenente a un set conosciuto di valori. Questo non è immediato solamente per problemi che hanno direttamente numeri interi come fenotipi ma può essere conveniente utilizzarli come codifica di un gruppo ristretto di valori: ad esempio se un determinato gene può assumere i valori {giallo, rosso, verde} risulterà efficace rappresentarli come {0,1,2} invece che con dei valori binari. In questo esempio i valori numerici sono stati attribuiti in maniera arbitraria, se invece i valori da codificare presentano un ordine naturale (ad esempio una intensità) il vantaggio è ancora maggiore.

2.3.1.3 Rappresentazione reale a virgola mobile: questo metodo viene utilizzato quando si necessita del sistema di rappresentazione più sensibile; infatti con i numeri reali decimali si può ad esempio rappresentare una grandezza continua piuttosto che discreta. Occorre sempre tenere presente che questi calcoli sono affidati a degli elaboratori elettronici che presentano intrinsecamente delle limitazioni nell' utilizzo di numeri decimali.

2.3.1.4 Rappresentazione di permutazioni: questo particolare caso include tutti quei problemi ove è fondamentale l'ordine con la quale una serie di eventi si verificano; la caratteristica peculiare è l'impossibilità di una ripetizione dello stesso valore che non rappresenterebbe una permutazione valida. È naturale pensare ai numeri interi come una possibile codifica assicurandosi però che gli operatori di variazione genetica non possano produrre risultati non compatibili con la rappresentazione. Vi sono due principali classi di problemi rappresentati da permutazioni: quelli basati sull' ordine temporale di questi eventi e quelli basati sull'adiacenza tra i valori. Le due possibili rappresentazioni consistono nell' utilizzare il valore dell'i-esimo elemento come denotazione dell'evento che occorre in quella posizione della sequenza oppure, sempre l'i-esimo elemento, può denotare la posizione della sequenza nella quale l'i-esimo evento occorre. Ad esempio, data la sequenza {colazione, pranzo, merenda, cena}, la permutazione {3,1,4,2} nella prima rappresentazione si traduce in {merenda, colazione, cena, pranzo} mentre con la seconda in {pranzo, cena, colazione, merenda}.

2.3.2 SELEZIONE PARENTALE

Le procedure di selezione degli individui da utilizzare come genitori per le generazioni successive possono approssimativamente distinguersi in due categorie:

2.3.2.1 Selezione Proporzionale al Fitness: con questo metodo vengono selezionati per la riproduzione gli individui che presentano i valori di fitness migliori: la probabilità che un singolo individuo venga scelto dipende dal suo valore assoluto di fitness comparato al valori assoluti di fitness dei restanti membri della popolazione. Questa è rappresentata dall'equazione $p_i = f_i / \sum_{j=1}^n f_j$ dove f rappresenta la

possibilità dell'*i*-esimo elemento di essere selezionato e *n* la dimensione della popolazione. Questo metodo presenta però alcuni inconvenienti, infatti individui con valori di fitness molto più alti della media prendono rapidamente il sopravvento sulla popolazione determinando una convergenza prematura e la conseguente perdita di diversità. Un altro difetto è rappresentato dalla mancanza di pressione selettiva nel caso tutti gli individui presentino valori di fitness molto simili, in questo caso questa selezione tende ad avere le stesse performance di una selezione casuale. Un particolare esempio è dato dalla cosiddetta selezione a roulette: ad ogni individuo è assegnato uno spazio sulla ruota proporzionale al proprio valore di fitness; viene calcolato il valore di fitness f_i di ogni individuo e la probabilità di selezione p_i con la precedente formula; successivamente si calcola la probabilità cumulativa $q_i = \sum_{j=1}^i p_j$ sempre per ognuno di essi. Una volta generato un numero casuale r compreso tra 0 e 1, se $r < q_1$ selezioniamo il primo cromosoma, altrimenti selezioneremo l'individuo x_i tale che $q_{i-1} < r \leq q_i$. Successivamente si procede alla ripetizione della generazione casuale di r e alla selezione un numero di volte pari a "n" per ottenere "n" nuovi candidati per la riproduzione.

2.3.2.2 Selezione a torneo: I precedenti metodi erano basati sull'assunzione che fosse possibile calcolare il valore di fitness di ogni individuo della popolazione. Questo procedimento può essere complicato e dispendioso per popolazioni molto numerose; inoltre non sempre è possibile associare ad ogni individuo un valore di fitness univocamente determinato. Invece è sempre possibile stabilire, tramite confronto, quale tra due individui presenti le caratteristiche migliori, senza per forza stabilire un valore esatto che ne determini il fitness. Questo tipo di selezione viene detta "a torneo". È molto utilizzato proprio per la caratteristica di non richiedere conoscenze globali sulla popolazione. La probabilità di un individuo di essere selezionato utilizzando questo metodo dipende dai seguenti fattori:

- La dimensione *k* del torneo: più è esteso, più è probabile che contenga elementi con fitness elevata.
- La probabilità che il "vincente" del torneo sia selezionato: questa solitamente corrisponde a 1 (certezza) ma esistono anche versioni con probabilità minori.

- Il reinserimento o meno degli individui: se al termine di un torneo gli individui scartati non possono essere ripescati allora i $k-1$ genotipi peggiori della generazione non avranno possibilità di essere scelti. In caso contrario anche il peggiore potrà avere alcune possibilità grazie a un torneo molto “fortunato”.

Sia questo tipo di selezione che quella a roulette presentano lo stesso difetto: i risultati possono essere molto differenti dalla distribuzione teorica calcolata in base alle probabilità. Nonostante questo inconveniente, rimane il modello di selezione più utilizzato negli algoritmi genetici moderni per via della sua semplicità e per la pressione selettiva facilmente regolabile: occorre infatti variare solamente il parametro che fissa la dimensione dei tornei.

2.3.3 MUTAZIONE

Negli algoritmi genetici è possibile suddividere gli operatori di mutazione a seconda del tipo di rappresentazione degli individui scelto inizialmente: binari, interi, reali e permutazioni.

2.3.3.1 Mutazione per rappresentazioni binarie

Nella rappresentazioni binarie la mutazione più comune consiste nel considerare ogni gene di un genotipo separatamente e, stabilita a priori una probabilità p_m di mutazione, variare eventualmente il valore da 0 a 1 oppure da 1 a 0. Di conseguenza, dato un individuo contenente L geni, il numero medio di questi che subirà la mutazione sarà pari a $L \times p_m$.

2.3.3.2 Mutazione per rappresentazioni a numeri interi

Per questo tipo di rappresentazioni vengono prevalentemente utilizzati due metodi considerando sempre una fissata probabilità di mutazione p_m indipendente per ogni gene:

- **Random Resetting**: è l'equivalente della mutazione binaria; con una certa probabilità p_m ogni gene può essere sostituito da un valore casuale calcolato all'interno di un certo intervallo di valori prestabilito.
- **Creep Mutation**: invece di sostituire il valore di un gene con un altro indipendente, si aggiunge o si sottrae con la stessa probabilità p_m un certo, piccolo valore all'allele oggetto della mutazione. Ogni valore da aggiungere o sottrarre viene calcolato stocasticamente indipendentemente per ogni gene.

2.3.3.3 **Mutazione per rappresentazioni a numeri reali:**

Per le rappresentazioni con numeri a virgola mobile vengono utilizzate tecniche analoghe a quelle per rappresentazioni a interi; i valori x'_i da aggiungere o sottrarre ai singoli geni x_i sottoposti a mutazione vengono calcolati in uno spazio continuo compreso tra due valori prefissati L e U invece che da un insieme discreto (i numeri interi, appunto). Questi metodi possono essere suddivisi in:

- **Mutazioni uniformi**: i valori x'_i sono scelti in modo uniforme e casuale dallo spazio [L,U].
- **Mutazioni non uniformi con distribuzione fissata**: i valori x'_i vengono calcolati casualmente da una distribuzione Gaussiana con media nulla e deviazione standard scelta dall'utente, limitata sempre all'interno dell'intervallo [L,U].
- **Mutazione polinomiale**[3][4]: La probabilità di mutazione è fissata dal parametro p_m , n è il numero degli alleli del genotipo passibili di mutazione e n_m è l'indice di distribuzione costituito da un numero reale non negativo. Per ogni allele x_i appartenente all'insieme n è impostato un range di possibili variazioni $[x_i^{lower}, x_i^{upper}]$ e ha una probabilità p_m di essere mutato. Viene quindi generato un numero random "r" e, se esso è minore di p_m , si procede alla mutazione nel seguente modo:
 - Si genera un nuovo numero random "u" compreso tra 0 e 1.
 - Si calcola il valore dei due parametri δ_{left} e δ_{right} appartenenti alle regioni a sinistra e a destra del genitore x_i nel seguente modo:

$$\bullet \quad \delta_{left} = 2u^{\frac{1}{1+n_m}} - 1 \quad \text{per } u \leq 0.5$$

- $\delta_{right} = 1 - (2(1 - u))^{\frac{1}{1+n_m}}$ per $u \geq 0.5$
- Si può successivamente generare il nuovo genotipo mutato x'_i come:
 - $x'_i = \begin{cases} x_i + \delta_{left}(x_i - x_i^{lower}) & \text{per } u \leq 0.5 \\ x_i + \delta_{right}(x_i^{upper} - x_i) & \text{per } u \geq 0.5 \end{cases}$

Figura 2.7 presenta un esempio di questo operatore di mutazione:

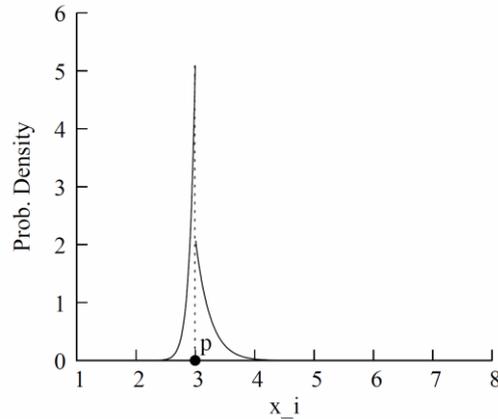


Figura 2.7: Funzione densità di probabilità della creazione di un genotipo mutato a partire da un genitore con allele $X_i = 3$, range di mutazione $[1,8]$ e indice $n_m=20$ [3]

2.3.3.4 Mutazione per rappresentazioni di permutazioni:

In questa tipologia i geni non possono più essere considerati separatamente in quanto occorre sempre assicurarsi che il risultato della variazione sia consentito dalla permutazione. Il genotipo va quindi considerato nella sua interezza. Gli operatori sotto evidenziati producono differenze relativamente piccole all'interno del singolo individuo; occorre però considerare che se il problema ha una rappresentazione basata sulle adiacenze dei singoli geni la modifica introdotta dalla mutazione potrebbe essere sostanziale.

- **Swap Mutation:** due geni vengono selezionati e i loro alleli (valori) vengono semplicemente scambiati di posto



Figura 2.8: Swap mutation[1]

- **Insert Mutation:** vengono sempre selezionati due geni e uno di questi viene spostato in modo da ritrovarsi affiancato all'altro spostando di conseguenza gli altri.



Figura 2.9: Insert Mutation[1]

- **Scramble Mutation:** in questo caso una porzione scelta casualmente del genotipo (anche l'individuo per intero) vede i relativi geni modificati nell'ordine (letteralmente "strapazzati").



Figura 2.10: Scramble Mutation[1]

- **Inversion Mutation:** vengono selezionati casualmente due geni ed invertiti gli ordini dei valori che compaiono tra di essi. La stringa viene divisa in 3 parti conservando i collegamenti all'interno di ognuna di esse. È la modifica più piccola che può subire una stringa appartenente a un problema basato sulle adiacenze degli alleli in quanto solo 2 collegamenti vengono modificati.



Figura 2.11: Inversion Mutation[1]

2.3.4 RICOMBINAZIONE/CROSSOVER:

Negli algoritmi genetici il crossover è la tecnica principale di variazione genetica. In letteratura sono presenti metodi diversi di *crossover* (Goldberg, 1989b; Brooker et al. 1997; Spears, 1997). Molti di essi sono stati designati appositamente per i problemi affrontati. Saranno invece descritte di seguito le tipologie generiche indipendenti dal problema più conosciute e in aggiunta il Simulated Binary Crossover (SBX), che verrà utilizzato nel capitolo quarto per alcuni studi sull'elettrofisiologia cardiaca. Viene solitamente proposto con una probabilità di evenienza p_c variabile

nell'intervallo $[0.5,1]$ detta *crossover rate*. Per ogni coppia di individui selezionati viene generato un numero casuale: se questo è minore di p_c i due figli si formano per ricombinazione, se invece è maggiore i genitori verranno direttamente copiati nella generazione successiva.

2.3.4.1 Crossover per rappresentazioni binarie

K-Point Crossover: i metodi one-point e two-point crossover sono i più comuni e i più semplici strumenti di ricombinazione **binaria**.

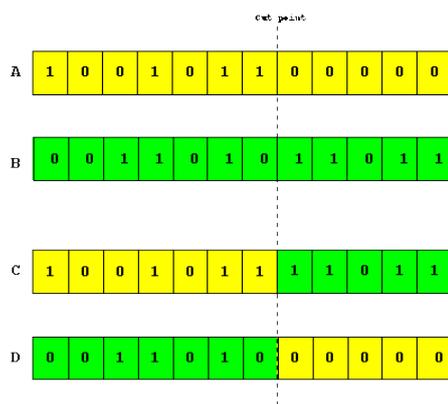


Figura 2.12: one-point crossover[5]

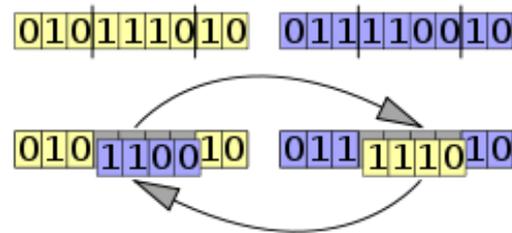


Figura 2.12bis: two-point crossover [6]

Come possiamo osservare dalla figura 2.12 nel primo caso viene selezionato casualmente un sito all'interno della stringa rappresentante l'individuo; gli alleli appartenenti a uno stesso lato di questo sito vengono scambiati tra i due genitori. Nel secondo caso (figura 2.12bis) vengono selezionati sempre casualmente due siti: gli alleli compresi in questo spazio si scambiano tra gli individui per formare la prole. Questo concetto può essere esteso a un k-point crossover dove vengono selezionati k siti diversi.

Uniform Crossover: è un altro comune metodo di ricombinazione **binaria** (Syswerda, 1989; Spears e De Jong, 1994) ove vengono selezionati casualmente una coppia di cromosomi e i relativi alleli occupanti la stessa posizione vengono scambiati nella prole con una probabilità p_e nota come probabilità di swapping. Solitamente come valore di p_e si utilizza 0.5.

2.3.4.2 Crossover per rappresentazioni a numeri interi

Per le rappresentazioni a **valori interi** vengono utilizzati gli stessi set di metodologie utilizzati per le rappresentazioni binarie.

2.3.4.3 Crossover per rappresentazioni a numeri reali

Per quanto riguarda invece le rappresentazioni **reali a virgola mobile** si presentano due opzioni principali:

- Utilizzo di operatori analoghi a quelli impiegati per la rappresentazione binaria. Invece dei valori 0 o 1 vengono scambiati durante la ricombinazione i valori a virgola mobile presenti negli alleli. Lo svantaggio di questa metodologia consiste nel non poter inserire nuovi valori durante il processo e lasciare questo compito esclusivamente alle mutazioni. Si parla cioè di ricombinazione discreta, infatti ogni individuo figlio “z” generato dalla combinazione di due genitori “x” e “y” presenterà dei valori per l’i-esimo gene $z_i = x_i$ oppure y_i .
- Utilizzo di altri operatori che, in ogni posizione corrispondente a un gene, creano un nuovo allele nel figlio con valore intermedio rispetto a quello dei genitori. In questo caso $z_i = \alpha x_i + (1 - \alpha)y_i$ ove il valore α è casuale anche se è prassi comune utilizzare un valore costante pari a 0.5. Queste tipologie di ricombinazione hanno il vantaggio di creare nuovo materiale genetico e quindi variabilità, con il conseguente svantaggio che in questo processo di “media” il range dei valori degli alleli nella popolazione per ogni gene si riduce. Questi operatori sono anche conosciuti come ricombinazione aritmetica o intermedia.

Ricombinazione Semplice: Una volta scelto un punto k di ricombinazione per il primo figlio vengono copiati i primi k alleli, i rimanenti sono costituiti dalla media aritmetica tra i corrispondenti alleli dei due genitori. Il secondo figlio è formato in modo analogo.

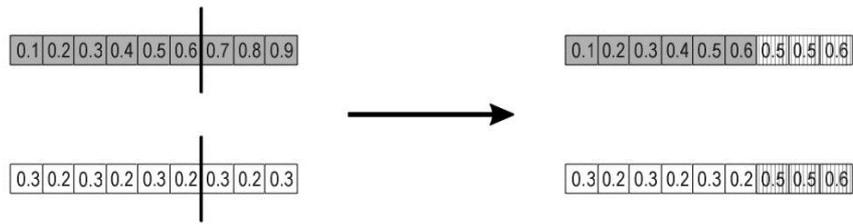


Figura 2.13: Ricombinazione Semplice[1]

Ricombinazione Aritmetica Singola: una volta scelto casualmente un allele k in questa posizione il valore nei due figli viene sostituito dalla media aritmetica tra i valori dell'allele k dei genitori. I restanti alleli vengono direttamente copiati da genitori a figli.

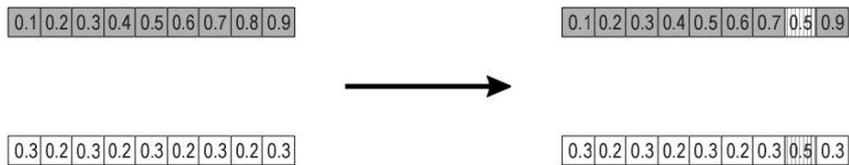


Figura 2.14: Ricombinazione Aritmetica Singola[1]

Ricombinazione Aritmetica Complessiva: è l'operatore utilizzato più comunemente. L'allele corrispondente ad ogni gene dei figli viene calcolato come media tra i corrispettivi nei genitori. Se il parametro α è pari a 0.5 con questo metodo si produrranno due cellule figlie identiche.

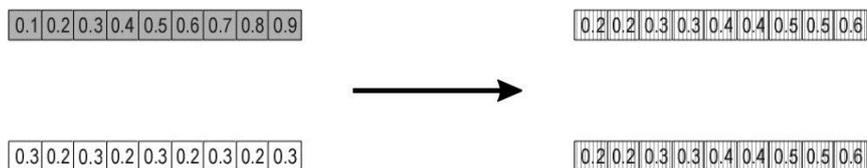


Figura 2.15: Ricombinazione Aritmetica Complessiva ($\alpha = 0.5$)[1]

Simulated Binary Crossover (SBX)[7][8] :

L'operatore *Simulated Binary Crossover (SBX)* venne sviluppato per avere a disposizione un crossover con una “*search power*” simile a quella del one-point crossover utilizzato per la rappresentazione binaria. Con il termine “*search power*” si intende la potenzialità di un operatore nel creare un figlio con una qualsiasi arbitraria composizione genetica a partire dai due genitori. La peculiarità di questo metodo consiste nel poter scegliere la “vicinanza” ai genitori dei figli generati.

Nella maggior parte dei casi (come negli operatori basati su numeri reali precedenti) viene utilizzata una distribuzione di probabilità centrata sui genitori e i figli sono conseguentemente generati in base a questa distribuzione. La prole, se ottenuta tramite una distribuzione di probabilità fissata, che non dipende dalla localizzazione dei genitori, rende la ricerca adattiva. Se ad esempio i genitori sono molto diversi probabilmente anche i figli lo saranno e presenteranno pochi tratti in comune con essi; questo accade generalmente nelle prime generazioni. Se invece i genitori hanno genotipi vicini ci si aspettano figli simili ad essi, come nelle ultime generazioni dell'esecuzione. Questo comportamento rende l'operatore adattivo ed è proprio il tratto caratteristico di somiglianza con il one-point binary crossover. Tra i due metodi vi sono però alcune differenze:

- Il One-point binary crossover non utilizza nessuna distribuzione di probabilità prefissata, possiamo associargliene solamente una implicita, dipendente dalla lunghezza della stringa che codifica la variabile.
- Nei crossover a rappresentazione basata sui numeri reali si fa un uso esplicito di distribuzione di probabilità, e le performance dell'operatore sono proprio basate su quest'ultima.

Nel one-point crossover entrambi i figli sono generati o nello spazio interno delimitato dai genotipi dei genitori o da quello esterno e prendono il nome rispettivamente di “contracting” ed “expanding” crossover. Inoltre la distanza di un figlio da un genitore è esattamente uguale a quella dell'altro dall'altro genitore.

L'SBX è stato sviluppato per avere le stesse proprietà appena descritte anche per gli algoritmi a rappresentazione reale. È stato sviluppato uno “*spread factor*”

adimensionale indicante il grado di dispersione dei figli generati rispetto ai propri genitori; matematicamente indicato da:

$$\beta = \left| \frac{c_1 - c_2}{p_1 - p_2} \right|$$

dove p_1 e p_2 rappresentano i genitori, c_1 e c_2 i figli. Se $\beta \leq 1$ si parla di “*contracting crossover*”, in caso di $\beta \geq 1$ invece di “*expanding crossover*”. Scrivendo i valori decodificati delle stringhe di due genitori arbitrari e scrivendo le stringhe dei figli da loro generati come funzioni del sito di crossover “ k ” sulla lunghezza della funzione, il fattore di spread β sarà scritto in termini di k . Da qui possiamo anche calcolare la probabilità di generare una coppia di figli aventi un determinato β . Questa probabilità è approssimata da una distribuzione di probabilità polinomiale nel seguente modo:

$$P_\beta = \begin{cases} 0.5(n+1)\beta^n & \text{se } \beta \leq 1 \\ 0.5(n+1)\frac{1}{\beta^{n+2}} & \text{altrimenti} \end{cases}$$

“ n ” rappresenta qualsiasi numero reale non negativo e viene detto indice. In figura 2.16 è mostrato il comportamento della distribuzione di probabilità al variare di n . Valori più grandi di questo parametro portano a maggiori probabilità di creare figli simili ai genitori. In questo modo si è ottenuto un operatore che crei un collegamento diretto tra i figli ed i genitori.

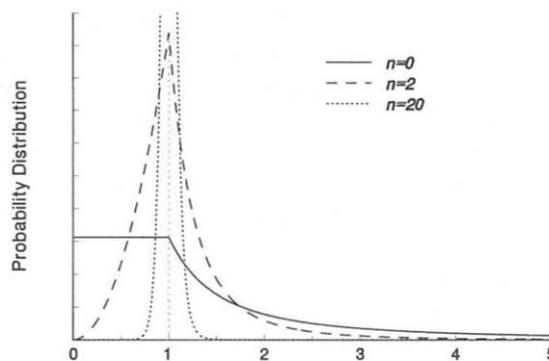


Figura 2.16: Distribuzione di probabilità usata nell' SBX per diversi valori dell'ordine polinomiale n [7]

Infine, per creare due figli c_1 e c_2 dai genitori p_1 e p_2 occorre seguire questi determinati passaggi:

- Generare un numero random “u” compreso tra 0 e 1
- Trovare un β' per il quale la probabilità cumulativa : $\int_0^{\beta'} P(\beta)d\beta = u$
- Ottenuto questo valore, i figli saranno ottenuti tramite
 - $c_1 = 0.5[(p_1 + p_2) - \beta'|p_2 - p_1|]$
 - $c_2 = 0.5[(p_1 + p_2) + \beta'|p_2 - p_1|]$

2.3.4.4 Crossover per rappresentazioni con permutazioni

L'ultimo gruppo di operatori di ricombinazione si basa sulle **rappresentazioni con permutazioni**. Queste presentano particolari difficoltà in quanto scambiando gli alleli delle stringhe tra i genitori per formare i figli, ma spesso non vengono conservati i collegamenti delle permutazioni. Per questo motivo sono stati implementati degli appositi operatori; saranno di seguito presentati il più comunemente utilizzato per i problemi di adiacenza e altri due caratteristici dei problemi basati sull'ordinamento.

Partially Mapped Crossover (PMX): Questo metodo è stato sviluppato da Goldberg e Lingle nel 1985 e oltre a preservare l'ordine e quindi i collegamenti all'interno del cromosoma produce anche sempre prole che rispetti le regole della permutazione. Due genitori vengono casualmente selezionati insieme a due siti di crossover altrettanto scelti casualmente. Come si evince da figura 2.17, il segmento del primo genitore (P1) compreso tra i due siti viene copiato direttamente nella stessa

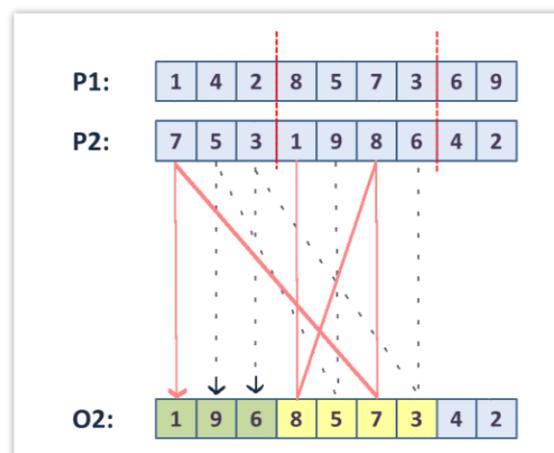


Figura 2.17: Partially Mapped Crossover

posizione del secondo figlio (O2). Successivamente si controlla il posizionamento di quegli elementi che compaiono nel segmento centrale del secondo genitore (P2) ma non in P1 (Sono 1,9,6). La posizione occupata dal 9 in P2 è occupata dal 5 in O2, quindi si potrà posizionare il 9 nella posizione lasciata vacante dal 5 in P2. La posizione occupata dal 6 in P2 è occupata dal 3 in O2, quindi è possibile posizionare il 6 nella posizione lasciata vacante dal 3 in P2. La posizione occupata dall'1 in P2 è occupata dall'8 in O2, si controllerà quindi prima la posizione occupata dall'8 in P2: questa è già occupata dal 7, quindi si cercherà in quale posizione compare quest'ultimo in P2 e si sarà ottenuta la posizione vacante ove collocare il valore 1. Come ultimo passo occorre copiare i rimanenti valori del genitore P2 nelle corrispondenti posizioni del figlio.

Order-Based Crossover: Questo operatore è stato sviluppato (Davis, 1985) per i problemi basati sull'ordinamento. Vengono selezionati casualmente due genitori e altrettanto casualmente due siti di crossover; come rappresentato in figura 2.18 i geni presenti all'interno di questi siti vengono direttamente copiati nel cromosoma figlio.

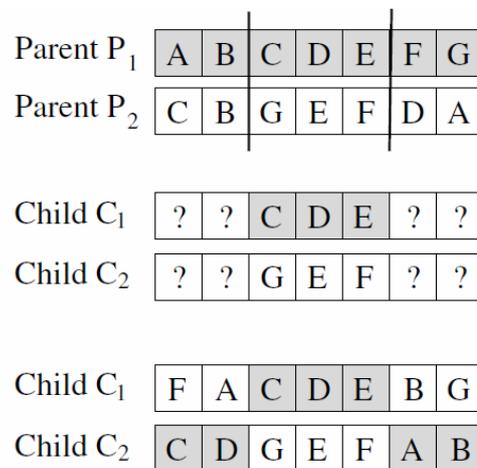


Figura 2.18: Order-based crossover [2]

Partendo dal secondo sito di crossover del secondo genitore vengono copiati i rimanenti valori inutilizzati nel primo figlio nello stesso ordine col quale compaiono nel secondo genitore ricominciando dall'inizio una volta giunti al termine del cromosoma. Il secondo figlio viene prodotto in modo analogo, invertendo il ruolo dei genitori.

Cycle Crossover: Come ultimo metodo, sempre riferito a problemi di ordinamento, il cycle crossover (Oliver et al., 1987) è rappresentato in figura 2.19.

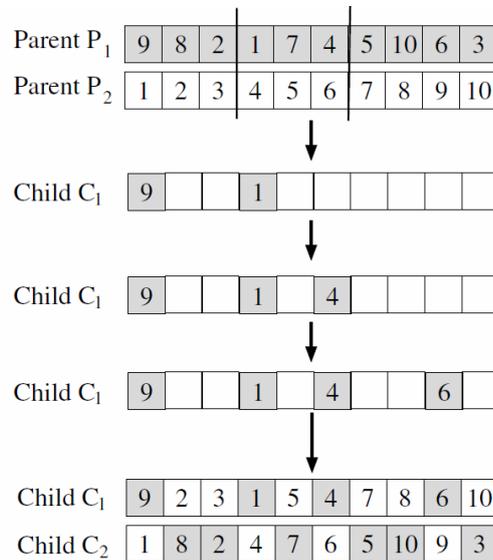


Figura 2.19: Cycle Crossover [2]

Considerando sempre due genitori casualmente scelti, si copierà il primo valore del primo genitore (P1) direttamente nella prima posizione del figlio (C1); successivamente occorre controllare il valore presente nella corrispondente (prima) posizione del secondo genitore (P2): individuato questo valore, in questo caso 1, lo si scriverà nel cromosoma figlio nella stessa posizione in cui compare in P1. Con lo stesso procedimento va controllato il valore nella stessa posizione in P2 e si continua fino al completamento del figlio. Si ottiene il secondo figlio nello stesso modo partendo dal primo elemento del secondo genitore.

2.3.5 Sostituzione

Come ultima componente degli algoritmi genetici si descriverà ora la sostituzione o selezione dei sopravvissuti. Una volta creati i nuovi figli tramite le mutazioni e il crossover andranno introdotti nella popolazione per formare la nuova generazione. Le tecniche più comuni sono le seguenti:

2.3.5.1 Cancellazione totale: Questo metodo consiste nella cancellazione totale della precedente generazione per essere rimpiazzata con lo stesso numero di cromosomi appena formati.

2.3.5.2 Basata sull'età: come il nome stesso suggerisce, questa tecnica consiste nell'imporre ad ogni individuo una sopravvivenza massima per un fissato numero di generazioni. Questo non preclude la permanenza di individui con alti valori di fitness, essi però dovranno attraversare, rimanendo immutati, i processi di mutazione e ricombinazione.

2.3.5.3 Basata sul fitness: Data una popolazione iniziale di μ individui e un numero λ di figli generati, occorrerà scegliere μ individui da un insieme $\mu + \lambda$. Questo può ovviamente essere fatto anche in base ai valori di fitness: saranno descritte di seguito due possibili tipologie di sostituzione:

- **Replace the Worst:** in questo metodo i peggiori λ individui vengono scelti per essere eliminati. Questo può facilmente portare a dei rapidi miglioramenti nella qualità della popolazione, a discapito però della variabilità. Si rischia quindi una convergenza prematura. Per questo motivo questo metodo viene utilizzato solamente nelle popolazioni molto numerose.
- **Elitarismo:** Con le normali tecniche di variazione e di sostituzione non vi è garanzia alcuna che il membro migliore della popolazione sopravviva al "cambio generazionale". Questa tecnica tiene invece traccia di questo individuo e lo copia direttamente nella generazione successiva. Se esso viene selezionato nel gruppo per essere sostituito e nessuno dei figli prodotti presenta un livello di fitness migliore, viene eliminato uno dei figli e mantenuto il cromosoma genitore.

CAPITOLO 3

Panoramica sugli algoritmi genetici nella bioingegneria

3.1 INTRODUZIONE

Nel capitolo precedente è stato presentato e analizzato il funzionamento dell'algoritmo genetico come strumento matematico di calcolo, senza concentrarsi sui suoi utilizzi pratici. Sebbene questi algoritmi vengono utilizzati nei più disparati campi della ricerca, una prima loro comparsa nell'ambito della bioingegneria la si può trovare tra il 1989 e il 1990 nello sviluppo di reti neurali ad opera di Harp et al. e de Garis.

Nel presente capitolo sono stati selezionate alcuni studi prettamente attinenti all'ambito bioingegneristico per fornire una panoramica generale sulla scalabilità di questo strumento.

3.2 BIOMECCANICA

Dalle ricerche bibliografiche svolte emerge un utilizzo recente degli algoritmi genetici nell'ambito della biomeccanica. Un primo esempio si può ritrovare nel lavoro di Y. Pei, Y.Kim, G. Obinata, E.Genda e D.Stefanov [1] dove l'algoritmo genetico viene utilizzato per l'ottimizzazione di funzioni di costo relative al design dei movimenti di riabilitazione e delle forze esterne per un sistema robotico di riabilitazione dei muscoli della spalla. In questo studio si è sviluppato un modello muscoloscheletrico tridimensionale della spalla limitando per semplicità a 3 i gradi di libertà dell'articolazione scapolo-omerale. Il modello è stato poi utilizzato per il calcolo dei parametri di forza e movimento con i quali impostare il macchinario per la riabilitazione robotica. I parametri vengono ottimizzati tramite l'algoritmo genetico e possono essere personalizzati a seconda della particolare lesione riportata dal paziente.

Come ulteriore esempio in ambito biomeccanico si ricorda anche il lavoro di Ishida T, Nishimura I, Tanino H, Higa M, Ito H e Mitamura Y. [2] sull'ottimizzazione tramite algoritmo genetico del design dello stelo della protesi femorale. Uno dei principali problemi relativi all'impianto di protesi femorali è dovuto al cedimento del cemento utilizzato per fissare quest'ultima al tessuto osseo del paziente. Queste rotture sono dovute a varie tipologie di stress meccanico rappresentate da adeguate funzioni costo. L'algoritmo genetico viene utilizzato per minimizzare queste funzioni. Lo studio ha infine identificato con successo una geometria dello stelo preferenziale tale in modo da determinare il minor stress nel cemento sia durante il movimento relativo a una camminata sia a quello relativo alla salita delle scale.

3.3 STRUMENTAZIONE BIOMEDICA

Questi algoritmi hanno trovato impiego anche nell'implementazione delle tecniche di interfacciamento tra il cervello e il calcolatore (**BCI**). Un esempio lo forniscono Lee C, Jung J, Kwon G e Kim L. [3]. Gli eventi motori e visivi provocano dei cambiamenti nell'EEG quali la risposta di desincronizzazione evento-relata (ERD) in specifiche aree cerebrali a specifici range di frequenze. Questi ERD non sono sempre di facile identificazione perché le aree e le frequenze ad essi associati non sono univoche. Il problema viene risolto con l'utilizzo di un algoritmo genetico: grazie a questo strumento viene ottimizzata l'individuazione delle aree cerebrali e del range di frequenze per una corretta classificazione degli ERD. Le migliori performance determinano perfezionamenti in varie applicazioni BCI come il controllo di dispositivi esterni e i supporti automatizzati di riabilitazione motoria.

Nel campo delle **bioimmagini** si può menzionare invece il lavoro di Li SX, Chen QY, Zhang YJ, Liu ZM, Xiong HL, Guo ZY, Mai HQ, Liu SH. [4] per la rilevazione di tumori nasofaringei utilizzando la spettroscopia di Raman e l'algoritmo genetico. L'utilizzo di quest'ultimo consiste nel distinguere tessuti normali e cancerogeni analizzando i risultati della spettroscopia.

Gli algoritmi genetici stanno riscuotendo successo nell'ambito dell'identificazione di tessuti tumorali, soprattutto attraverso analisi di bioimmagini. Non mancano però

utilizzi anche nel campo della terapia, come presentato dallo studio di Tang MT, Chen CM, Zhou LH, Lü QW, Wang ZY, Chen GJ., [5] dove l'algoritmo è utilizzato per ottimizzare l'intensità dei raggi nella IMRT (*intensity modulated radiation therapy*). I risultati hanno mostrato come gli algoritmi genetici abbiano ottimizzato con successo la distribuzione della dose di raggi con un tempo di elaborazione clinicamente accettabile.

Le applicazioni non si fermano all'analisi delle immagini ma possono abbracciare anche quelle del **suono**. Ad esempio il riconoscimento di patologie polmonari attraverso il rumore del flusso d'aria durante la respirazione è sempre stato un importante obiettivo della medicina, da quella antica a quella moderna. Nel lavoro di Güler I, Polat H, Ergün U. [6] l'utilizzo combinato di una *neural network* e di un algoritmo genetico ha permesso la costruzione di un sistema in grado di stabilire la presenza o meno di disturbi nel normale flusso d'aria, semplicemente analizzando il rumore da essa prodotto.

Per quanto riguarda l'utilizzo correlato all'ambito cardiaco, verranno di seguito forniti due esempi: uno sull'utilizzo degli algoritmi genetici con l'elettrocardiogramma (**ECG**) e uno sull'analisi della propagazione elettrica in tessuti cardiaci parzialmente danneggiati.

Nel primo caso, uno studio di Sarikaya S, Weber G, Dogrusoz Y.S ha descritto l'utilizzo degli algoritmi genetici come metodo di regolarizzazione per la soluzione del problema inverso dell'elettrocardiografia [7]. La distribuzione dei potenziali cardiaci sopra la superficie del cuore è un utile strumento per analizzare la presenza in esso di eventuali difetti. Normalmente misure dirette di questi potenziali richiedono procedure altamente invasive; un'alternativa è rappresentata dalla ricostruzione di questi potenziali epicardici attraverso quelli registrabili sulla superficie del corpo. In questo studio viene utilizzato un algoritmo genetico per regolarizzare il problema mal condizionato della ECG inversa e i risultati mostrano come questa scelta sia soddisfacente, utilizzando gli algoritmi combinati ai risultati di altri metodi convenzionali di regolarizzazione, come quello di Tikhov.

Verrà citato infine, riguardo il fenomeno di aritmia da rientro del potenziale d'azione cardiaco in un tessuto eccitabile, il lavoro di Scarle S. e Clayton R.H. [8].

La propagazione delle onde di potenziale d'azione nel cuore determinano la contrazione del muscolo cardiaco e il flusso sanguigno; una propagazione anormale può portare ad aritmie cardiache, tra le più pericolose ricordiamola tachicardia e la fibrillazione ventricolare, cause frequenti di morte cardiaca. Queste patologie possono essere causate da fenomeni di rientro del potenziale d'azione cardiaco: l'onda di depolarizzazione, espandendosi nel muscolo cardiaco, può incontrare blocchi unidirezionali rappresentati da tessuti danneggiati. In questo caso l'onda di depolarizzazione può aggirare questi "ostacoli", impiegando però del tempo; se lo stimolo, tornato al punto di partenza ove aveva incontrato il blocco, incontra cellule eccitabili (precedentemente attivate) che hanno terminato il periodo refrattario, essa può produrre uno sfasamento con l'onda primaria di depolarizzazione scandita invece dal nodo seno-atriale e causare quindi aritmia.

In questo studio è stato utilizzato un modello computazionale di propagazione del potenziale d'azione per indagare sistematicamente come il comportamento aritmogenico possa originarsi in presenza di tessuti sia normalmente eccitabili che non eccitabili. Questi ultimi sono stati distinti in due categorie: tessuti con conducibilità elettrica ma non eccitabili e tessuti non connessi elettricamente. L'algoritmo genetico viene utilizzato per evolvere le strutture aritmogeniche e il loro posizionamento, studiandone poi la presenza o meno di aritmogenesi. Una caratteristica particolare di questi algoritmi genetici è il loro obiettivo, opposto a quello dell'evoluzione naturale. Normalmente infatti la soluzione con valore di fitness più elevato rappresenta quella biologicamente più funzionale; in questo caso è il contrario: la miglior soluzione è rappresentata dalla peggior condizione patologica. Lo studio infine ha dimostrato come i tessuti non eccitabili ma conducibili elettricamente presentino un comportamento meno aritmogenico di quelli elettricamente disconnessi.

Una volta presentati questi esempi relativi ai più svariati settori della bioingegneria, nel capitolo seguente si indagherà più approfonditamente sull'utilizzo degli algoritmi genetici nella modellistica cardiaca.

CAPITOLO 4

Ottimizzazione tramite algoritmi genetici nello studio dell'elettrofisiologia cardiaca

Parte prima

Nel capitolo seguente l'elaborato si focalizzerà sull'utilizzo degli algoritmi genetici nell'ambito della modellistica cardiaca. In particolare verrà esposto come questo strumento si sia rivelato di estrema importanza per l'identificazione parametrica di modelli del potenziale d'azione cardiaco e per la trasformazioni intra-specie e inter-specie degli stessi.

In questa prima parte del capitolo verranno introdotti concetti, nomenclatura e tecniche fondamentali che saranno utilizzate nelle sperimentazioni a seguire. Per una descrizione più tecnica ed esaustiva si rimanda alla bibliografia indicata.

4.1 POTENZIALE D'AZIONE

In fisiologia, un potenziale d'azione[1][2] è un evento elettrico di breve durata durante il quale si verifica un repentino incremento e successivo decremento del potenziale elettrico di membrana cellulare seguendo particolari morfologie. Il potenziale di membrana è essenziale per la vita della cellula, infatti la membrana regola il passaggio tra l'esterno e l'interno e viceversa di tutte le sostanze dotate di carica elettrica e veicola le informazioni proprio attraverso i potenziali d'azione. Questi potenziali si verificano in vari tipi di cellule animali, dette cellule eccitabili, come quell'endocrine, neuronali, muscolari; nel nostro caso ci concentreremo sulle cellule del miocardio. In queste cellule il potenziale della membrana a riposo è di circa -90 mV. Questo è dovuto a differenti concentrazioni di ioni ed è mantenuto costante da particolari pompe ioniche. Il potenziale d'azione delle cellule del

miocardio regolano la contrattilità del muscolo cardiaco e conseguentemente le fasi di sistole e diastole responsabili della circolazione sanguigna.

Il potenziale d'azione cardiaco è caratterizzato dalle seguenti quattro fasi, come mostrato in figura 4.1:

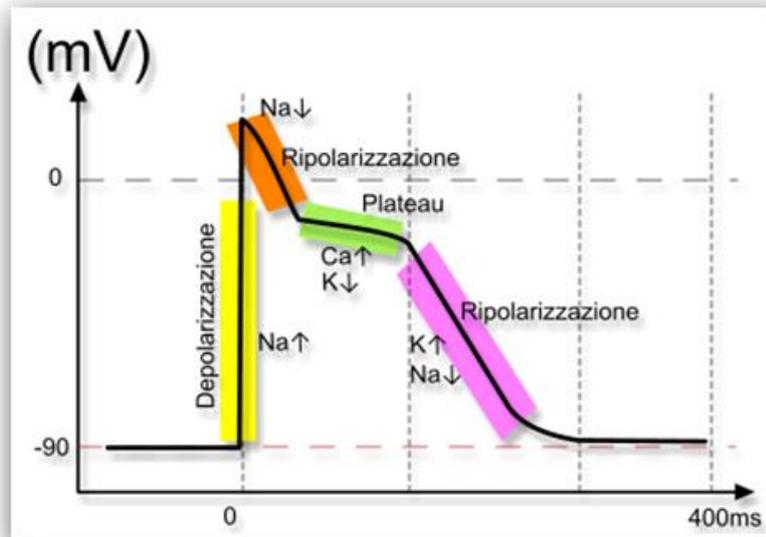


Figura 4.1: Fasi di un potenziale d'azione[3]

- Fase 0 - Depolarizzazione Rapida: è provocata da uno stimolo elettrico che superi il valore di soglia; è dovuta quasi esclusivamente all'ingresso di ioni Na^+ avvenuto in seguito all'aumento di conduttanza g_{Na} . Questo movimento ionico provoca la successiva apertura di altri canali del sodio, con un meccanismo detto a "feedback positivo". La corrente **entrante** scaturita è molto rapida e di ampiezza elevata, tuttavia altrettanto repentinamente la conduttanza ritorna su valori di riposo. I canali rimangono poi disattivati finché la cellula non viene completamente ripolarizzata. In questa fase avviene l'inversione del potenziale di membrana, passando da un valore negativo ad uno positivo.
- Fase 1 - Ripolarizzazione Precoce: questa fase rispecchia l'inattivazione sopra citata dei canali Na^+ ma è principalmente dovuta all'apertura dei canali del

potassio, e quindi a un relativo aumento della conduttanza g_K . Si forma così una corrente uscente transitoria ripolarizzante chiamata I_{to} .

- Fase 2 - Plateau: è la fase principalmente responsabile della durata del potenziale d'azione (APD). In questa fase gli ioni Ca^{2+} e in parte ancora gli ioni Na^+ entrano nella cellula attraverso canali definiti "long lasting", ovvero con apertura e chiusura molto lenta. L'apertura di questi canali provoca un aumento della conduttanza al calcio g_{Ca} . Questi si attivano quando il potenziale diviene meno negativo e formano il plateau quando l'ingresso di ioni calcio eguaglia la fuoriuscita di ioni potassio, la quale avviene secondo gradiente.
- Fase 3 - Ripolarizzazione Finale: l'uscita degli ioni potassio dalla cellula rende l'interno di essa negativo rispetto all'esterno, la membrana si ripolarizza ponendo fine al plateau. Questa fase è contraddistinta da un aumento della conduttanza del potassio g_K e alla riduzione di g_{Ca} . La corrente dovuta al potassio non è più controbilanciata da quelle del calcio e del sodio, contribuendo quindi alla ripolarizzazione finale della cellula.
- Fase 4 - Ripristino e Periodo Refrattario: questa fase è favorita dalla presenza di altri meccanismi di trasporto attivi come la pompa sodio-potassio. Essa trasporta tre ioni sodio al di fuori della cellula ogni due ioni potassio veicolati all'interno. Vi è poi uno scambiatore Na/Ca che espelle uno ione calcio sfruttando il gradiente del sodio e infine una $Ca-ATPasi$ che espelle ioni calcio mediante idrolisi di ATP. Una volta tornata nelle condizioni iniziali la cellula attraverserà un periodo refrattario durante il quale non è possibile innescare un nuovo potenziale d'azione. In realtà, un nuovo stimolo non avrebbe prodotto alcun potenziale già a partire dalla fase 0, subito dopo all'innescamento del potenziale. Durante la fase 3 si assiste alla riapertura dei canali del sodio; da questo momento in poi è possibile scatenare un nuovo potenziale d'azione, ottenibile solamente con uno stimolo più intenso. Il periodo refrattario è indispensabile in quanto permette il completo riempimento del ventricolo

cardiaco prima della successiva contrazione. Una volta terminato è possibile l'innescò di un nuovo potenziale con una stimolazione normale.

4.1.1 ARITMOGENESI CORRELATA AL POTENZIALE D'AZIONE – ALTERNANS

La presenza di alternans [4] caratterizza una condizione nella quale il battito del cuore alterna forti e deboli contrazioni nonostante una frequenza cardiaca costante. È stata inizialmente osservata in pazienti con arresto cardiaco. Tipicamente le alternans si manifestano a frequenze cardiache elevate, nonostante ciò alcune condizioni patologiche come ischemia o malfunzionamenti a livello ionico possono causare l'insorgere di questa patologia anche a frequenze inferiori. Con “*mechanical alternans*” ci si riferisce alla vera e propria alterazione macroscopica dell'intensità di contrazione, mentre con “*electrical alternans*” o semplicemente “alternans” si descrive il comportamento elettrico associato a livello del potenziale d'azione. Questo è particolarmente evidente durante la fase di ripolarizzazione: test in vitro hanno mostrato alterazioni della durata del potenziale d'azione (APD) sia concordanti che discordanti con il comportamento meccanico, talvolta a battiti più intensi corrispondevano potenziali più prolungati, talvolta lo stesso effetto era correlato a battiti più deboli [5].

Questa condizione può anche essere osservata durante una normale ECG come una alterazione del segmento ST e della forma e ampiezza dell'onda T. Questo particolare comportamento è detto *T-Wave Alternans* (TWA).

Le alternans cardiache sono state associate ad un aumento dell'incidenza delle aritmie in varie condizioni [5][6], per questo riflettono direttamente la presenza di un substrato aritmogenico. Recentemente, come sarà illustrato nel prossimo studio, si è sviluppato un particolare interesse nel fenomeno, in quanto viene ritenuto un valido “segnale premonitore” di patologie aritmiche per scongiurare soprattutto morti improvvise in pazienti ad alto rischio[7][8].

Alcuni studi hanno inoltre mostrato che il fenomeno elettrico caratteristico delle alternans non sarebbe la causa del comportamento meccanico ma esattamente il contrario: infatti bloccando la contrazione meccanica tipica delle alternans si assisteva anche alla soppressione del fenomeno elettrico [5]. Come sarà mostrato di seguito altri studi si sono concentrati invece sullo studio di modelli cardiaci corrispondenti alla presenza di alternans per poter eseguire test in silico, spesso impossibili per via clinica.

4.2 TECNOLOGIE DI STUDIO

La maggioranza degli studi citati e anche quelli che saranno affrontati nello specifico sono stati resi possibili grazie a particolari tecniche di registrazioni dell'attività elettrica intracellulare e di membrana introdotte a partire dagli anni 40 e successivamente raffinate e diversificate nei decenni a seguire. Vengono di seguito illustrate le principali metodologie.

4.2.1 VOLTAGE CLAMP:

La tecnica del Voltage Clamp [9] viene utilizzata nello studio dell'elettrofisiologia per misurare le correnti ioniche che attraversano la membrana cellulare delle cellule eccitabili mentre si mantiene artificialmente costante il potenziale di membrana. Queste cellule contengono varie tipologie di canali ionici, alcuni dei quali sono controllati nella loro apertura proprio dalla differenza di potenziale. La tecnica è attribuita Kenneth Cole e George Marmont i quali negli anni 40 scoprirono la possibilità di utilizzare due elettrodi e un circuito a feedback per mantenere costante il potenziale della membrana cellulare.

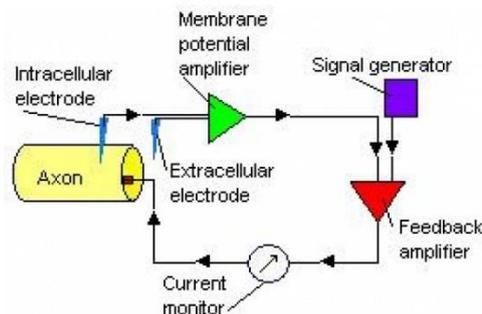


Figura 4.2: Illustrazione della tecnica di Voltage Clamp: Il primo amplificatore misura il potenziale di membrana e lo invia all'amplificatore a feedback negativo il quale sottrae questo valore dal potenziale impostato artificialmente tramite il generatore di segnale. Questo segnale verrà successivamente amplificato ed inviato all'interno della cellula (in questo caso l'assone di calamaro gigante) attraverso l'elettrodo di corrente.[9]

Come illustrato in figura 4.2, il Voltage Clamp comprende un generatore di corrente e due elettrodi; in primo luogo si procede alla registrazione del potenziale di membrana tramite un primo elettrodo, detto di voltaggio, posizionato a terra, e un secondo, detto di corrente, inserito all'interno della cellula. Una volta stabilito il potenziale al quale vogliamo mantenere la cellula, il compito di questo “equilibrio forzato” sarà espletato da un meccanismo a feedback negativo: gli elettrodi sono collegati ad un amplificatore e ogniqualvolta il potenziale devia dal valore impostato, questo genera un segnale di errore determinato dalla differenza tra il potenziale impostato e quello attuale della membrana cellulare. Viene quindi generata una corrente all'interno della cellula che, essendo opposta e della stessa ampiezza di quella ionica, riporta il segnale di errore a zero. Questa corrente può essere misurata fornendo importanti informazioni riguardo il flusso di corrente attraverso la membrana cellulare.

“Il fondamentale vantaggio di questo metodo viene dal fatto che, delle due variabili da cui dipende la conduttanza ionica membranale (potenziale di membrana e tempo), una, cioè il potenziale, viene eliminata essendo bloccata ad un valore costante.” [10] La tecnologia del Voltage Clamp è stata sviluppata prima dell'avvento dei micro elettrodi, vennero quindi usati dei sottili cavi ricoperti che, per le loro dimensioni, potevano essere applicati solo a cellule particolarmente grandi. Per questo motivo la

maggior parte delle prime sperimentazioni avvennero utilizzando l'assone di un calamaro gigante, che può raggiungere il millimetro di spessore.

Con questa cellula e con questa tecnologia, nel 1963 Alan Hodgkin e Andrew Huxley vinsero il premio Nobel per la medicina scoprendo come le correnti ioniche dessero vita al potenziale d'azione.

4.2.2 CURRENT CLAMP

La tecnica del Current Clamp [11] registra il potenziale di membrana di cellule eccitabili iniettando in esse una corrente tramite un elettrodo di registrazione. A differenza del Voltage Clamp, ove il potenziale di membrana è mantenuto a un valore costante determinato dallo sperimentatore, in questa modalità il potenziale di membrane è libero di variare mentre la corrente che la attraversa è mantenuta costante a un valore noto. Successivamente l'amplificatore registra qualsiasi variazione di potenziale della cellula, sia esso spontaneo, sia esso il risultato di una stimolazione.

Questa tecnica è utilizzata per studiare la risposta di una cellula eccitabile quando essa è attraversata da una corrente. Il primo elettrodo, detto di stimolazione, serve per iniettare corrente all'interno della membrana e per questo è collegato ad un generatore di corrente costante regolabile; il secondo, detto di derivazione, è invece collegato a un dispositivo di misurazione (millivoltmetro) che permette di registrare il potenziale della membrana a riposo e le sue variazioni determinate dall'inserimento della corrente tramite il primo elettrodo.

4.2.3 PATCH CLAMP

La tecnica del Patch Clamp [12] è considerata un'evoluzione del Voltage Clamp; La sua introduzione, ad opera di Neher e Sakmann (premi Nobel in Fisiologia e Medicina nel 1991), ha reso possibile la registrazione delle correnti dei singoli canali ionici dimostrando il loro coinvolgimento nella generazione del potenziale d'azione delle cellule eccitabili.

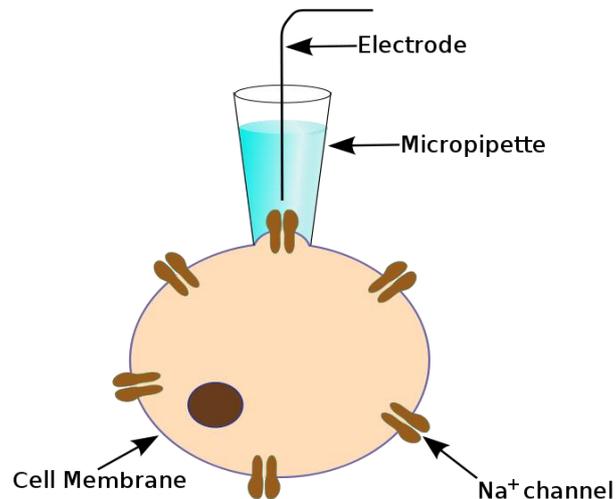


Figura 4.3: Patch Clamp[12]

Una rappresentazione schematica del principio di funzionamento è fornita in figura 4.3; come unico elettrodo viene utilizzata una micropipetta di vetro avente un diametro di punta di pochi micrometri. Questa, invece di essere inserita all'interno della membrana, si appoggia su di essa esercitando una leggera pressione. Una volta in contatto con la membrana si applica una leggera suzione per far sì che un piccolo lembo di essa sporga all'interno della pipetta, formando un sigillo tra i due corpi caratterizzato da una resistenza di vari gigaohm (gigaohm seal). In questo modo è possibile isolare elettronicamente la porzione di membrana e quindi delle correnti che la attraversano ottenendo la produzione di un rumore elettrico trascurabile. Un cavo di argento è posizionato dentro la pipetta in contatto con la soluzione e trasporta la corrente elettrica fino all'amplificatore.

La superficie di membrana ricoperta dalla punta può ricoprire uno o pochi canali ionici, rendendo questa tecnica estremamente selettiva. L'interno della pipetta è riempito dalla soluzione intracellulare. Lo sperimentatore può variare questa soluzione o aggiungervi farmaci per studiare le reazioni dei canali ionici.

4.2.4 DYNAMIC CLAMP

La tecnica del *Dynamic Clamp* è una tecnica ibrida a circuito chiuso di tipo sperimentale-computazionale che permette di studiare una cellula vivente attraverso

perturbazioni indotte tramite *current clamp*. Queste perturbazioni sono funzioni calcolate in base a misure istantanee del comportamento elettrico della cellula.

Questa tecnica si rende molto utile durante la ricerca sulle funzioni dei canali ionici e sulle dinamiche di corrente delle membrane cellulari [13][14][15][16]. Un'ulteriore caratteristica di questo metodo consiste nel poter utilizzare contemporaneamente cellule viventi e modelli cellulari artificiali [17][18][19], avendo così la possibilità di ottenere una rete ibrida.

Con l'evoluzione di questa tecnica, le varie implementazioni sono diventate via via più complesse[20][19] e al contempo hanno permesso di investigare fenomeni e quesiti che precedentemente non erano affrontabili con altre metodologie.

4.3 MODELLI CARDIACI

I modelli cardiaci seguenti sono riproposti brevemente al fine di chiarificare la comprensione delle prossime sperimentazioni.

4.3.1 MODELLO HODGKIN HUXLEY

Grazie alle tecniche di clamp sopra descritte, dagli anni 40 in poi si è potuti giungere a risultati nel campo dell'elettrofisiologia prima insperati. Nel 1952 Hodgkin e Huxley pubblicarono numerose misure di corrente di membrana ottenute con il voltage clamp e di seguito anche un modello [21][22] del potenziale d'azione basato sugli studi del già citato assone di calamaro gigante. Vennero formulate delle semplici descrizioni quantitative delle correnti ioniche di sodio e potassio attraverso la membrana. In figura 4.4 è riproposto l'equivalente elettrico del modello:

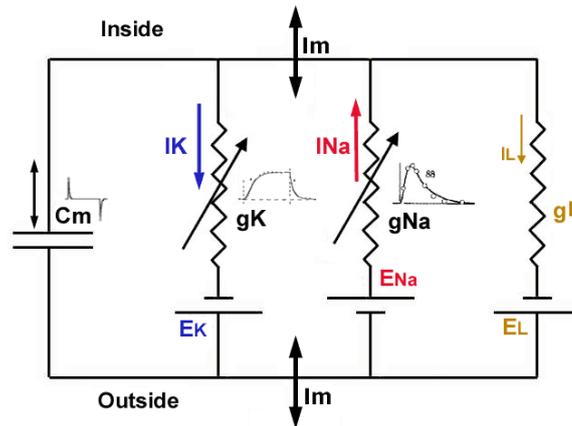


Figura 4.4: Modello elettrico equivalente di Hodgkin & Huxley [23]

Possono essere identificati due componenti principali: il condensatore rappresenta biologicamente il caricamento della capacità di membrana dovuta all'accumulo di diverse concentrazioni ioniche a cavallo dei lati di essa; gli altri tre rami, in parallelo, descrivono invece il movimento specifico degli ioni che la attraversano. Quest'ultima parte è suddivisa in tre componenti distinte:

- I_{Na} : corrente di sodio
- I_K : corrente di potassio
- I_L : corrente di leakage (determinata principalmente dagli ioni Cl^-)

Il circuito è invece rappresentato dall'equazione differenziale

$$C_m \frac{dV_m}{dT} + I_{ion} = I_{ext}$$

dove C_m rappresenta la capacità di membrana, V_m il suo potenziale e I_{ext} la corrente di stimolo applicata durante il Voltage Clamp. La corrente I_{ion} invece rappresenta il flusso netto di corrente attraverso la membrana e questa a sua volta è espressa da:

$$I_{ion} = -g_{Na}m^3h(V_m - V_{Na}) + g_Kn^4(V_m - V_K) + g_L(V_m - V_L)$$

dove g_{Na} , g_K , g_L sono le conduttanze associate alle precedenti correnti; V_{Na} , V_K , V_L i corrispettivi potenziali di equilibrio. I parametri n , m , h sono intrinsecamente legati al concetto di passaggio ionico di questo modello: se ad esempio il passaggio degli ioni potassio fosse controllato da molteplici "particelle" della membrana, ognuna delle quali con una probabilità "n" di trovarsi nella corretta posizione di apertura e

supponendo di avere quattro particelle; si avrà quindi una probabilità di “apertura totale” uguale a n^4 . Queste supposizioni trovano conferma considerando come n^4 imiti proprio la crescita e la decrescita nel tempo della conduttanza g_K . Un analogo ragionamento lo si può seguire per m^3h : unica differenza, la presenza di un ulteriore parametro, dovuta alla presenza di due processi di trasporto ionico opposti per il sodio, rappresentati qui da due particelle opposte.

L’equazione differenziale che invece governa ogni singola funzione di probabilità p_i (nello specifico m, n, h) è la seguente:

$$\frac{dp_i}{dT} = \alpha p_i(V)(1 - p_i) - \beta_i(V)(p_i)$$

α e β rappresentano rispettivamente le velocità di transizione dallo stato aperto a quello chiuso e viceversa.

Sulla base dei risultati sperimentali ottenuti, Hodgkin e Huxley stimarono che la permeabilità di membrana variasse in modo dinamico indipendentemente per ogni ione; riuscirono inoltre a intuire la presenza di canali di trasporto ionici selettivi nonostante non se ne conoscesse ancora l’esistenza. Queste formulazioni, per la loro potenza espressiva, sono tutt’oggi utilizzate come base per molti modelli di potenziale d’azione.

4.3.2 MODELLO DI BEELER REUTER

Il modello sviluppato da Beeler e Reuter nel 1977 fu il primo modello di potenziale d’azione ventricolare di un mammifero. Il modello utilizza 4 delle 8 correnti ioniche conosciute al momento della ricerca per le cellule eccitabili del muscolo cardiaco:

- Corrente veloce entrante di sodio I_{Na}
- Corrente tempo-dipendente uscente di potassio I_K
- Corrente tempo-indipendente di potassio I_{K1}
- Corrente lenta entrante di calcio I_{Si}

L'innovazione più importante di questo modello consiste nell'introduzione di una rappresentazione della corrente ionica di calcio intracellulare. Per maggiori informazioni su questo modello si rimanda alla letteratura [24][25].

4.3.3 MODELLO LUO-RUDY LRI

Venne pubblicato nel 1991 da C.H. Luo e Y.Rudy [26] per rappresentare il potenziale d'azione cardiaco di un miocita ventricolare di guinea pig ed è principalmente basato sul modello Beeler Reuter. Vennero riformulati i coefficienti delle frequenze di apertura e chiusura dei canali del sodio, accelerandoli, e soprattutto, grazie a studi successivi al Beeler Reuter, vennero aggiunte altre correnti ioniche:

- Corrente di potassio di plateau I_{Kp}
- Corrente di background di potassio a conduttanza costante.

Il modello poteva contare su 6 differenti tipologie di correnti e 9 variabili, una delle quali poteva essere approssimata dal suo valore di regime e sostituita da una funzione; in questo modo per il calcolo del modello erano necessarie solamente 8 variabili.

4.3.4 MODELLO DI NYGREN

Il modello di Nygren[27] è stato sviluppato nel 1998 e consiste in un modello matematico di un miocita atriale umano; è basato su registrazioni elettrofisiologiche di cellule atriali cardiache isolate ottenute grazie al Voltage Clamp. È costituito dal circuito equivalente di Hodgkin - Huxley per la rappresentazione del sarcolemma, associato con un modello a compartimento fluido che include lo spazio intracellulare, il *cleft* e il *bulk*. Il *cleft* rappresenta lo spazio limitrofo al miocita, ove possono verificarsi fenomeni di accumulo o penuria di ioni, mentre il *bulk* lo spazio extracellulare.

Queste formulazioni resero possibile la ricostruzione dei potenziali d'azione della maggioranza delle cellule atriali umane in laboratorio e posero anche ottime basi per le sottostanti teorie sulle correnti ioniche.

Il modello pone particolare attenzione sulla corrente sostenuta uscente (I_{sus}), in quanto ritenuta la principale responsabile nella determinazione della durata del potenziale d'azione insieme alla corrente transitoria uscente del potassio e la corrente ionica del calcio.

Parte seconda

Una volta introdotti i concetti, i modelli e le tecnologie più importanti che hanno gettato le basi dello studio dell'elettrofisiologia cardiaca, vengono ora proposti due importanti studi recenti inerenti l'identificazione di modelli di potenziale d'azione cardiaco e la loro peculiarità di poter essere trasformati per rappresentare diverse specie o diverse regioni del cuore.

Il primo studio "*Cardiac Myocyte Model Parameter Sensitivity Analysis and Model Transformation Using Genetic Algorithm*" di Armen R. Kherlopian, Francis A. Ortega e David J. Christini [28] mostra il diretto collegamento tra i parametri utilizzati per la costruzione del modello cardiaco e la conseguente espressione fenotipica, ovvero la morfologia del potenziale d'azione. Risulta sviluppato in tre fasi distinte; le prime due verranno affrontate nel sottocapitolo 4.2 e tratteranno rispettivamente:

1. i risultati conseguiti studiando la sensibilità di un modello di potenziale d'azione cardiaco ai parametri che lo descrivono. Questi parametri, rappresentati dalle conduttanze, vengono variati al fine di identificare quali di essi concorrono maggiormente alla determinazione della durata del potenziale d'azione di un miocita ventricolare.
2. un approccio basato sugli algoritmi genetici per individuare i parametri del modello che meglio riproducono (fittano) il comportamento nominale di un miocita cardiaco affetto da alternans.

La terza parte della sperimentazione verrà invece affrontata nel sottocapitolo 4.5 e tratterà la trasformazione della morfologia di un potenziale d'azione ricavato da un modello di miocita atriale umano in quella, ricavata sperimentalmente, di un guinea pig. Lo stesso sottocapitolo presenterà inoltre un ulteriore studio ad opera di Corina T. Bot, Armen R. Kherlopian, Francis A. Ortega, David J. Christini e Trine Krogh-Madsen: "*Rapid Genetic algorithm optimization of a mouse computational model: benefits for anthropomorphization of neonatal mouse cardiomyocytes*" [36]. In quest'ultimo verrà approfondito il tema della trasformazione del potenziale d'azione,

questa volta effettuata non su un modello matematico ma su un miocita ventricolare vivente opportunamente isolato.

4.4 IDENTIFICAZIONE DI MODELLI CARDIACI DEL POTENZIALE D'AZIONE TRAMITE ALGORITMO GENETICO

Nel presente sottocapitolo verrà affrontata l'analisi delle prime due fasi dello studio di Kherlopian et al. [28] sulla sensibilità di modello e sulla sua identificazione tramite algoritmo genetico. Lo sviluppo di modelli per l'elettrofisiologia cardiaca riveste una grande importanza per la possibilità che questi offrono nell'effettuare simulazioni altresì difficoltose o addirittura impossibili per via clinica. In particolare modo sono stati utilizzati nello studio dell'aritmogenesi nei miociti dei tessuti cardiaci al fine di investigarne l'elettrodinamica. La possibilità di effettuare queste simulazioni è vista con grande interesse anche in virtù della gravità delle patologie aritmiche nell'uomo moderno; si stima infatti che 4-5 milioni di persone muoiano annualmente per arresto cardiaco [29]. In questi modelli l'espressione fenotipica è costituita dalla morfologia del potenziale d'azione la quale, come già riportato, dipende strettamente da correnti (e quindi relative conduttanze) ioniche che attraversano la membrana cellulare di un miocita. Fra queste cellule vi è una variabilità fenotipica dipendente da fattori quali la sorgente all'interno del cuore, la variabilità genetica e anche l'utilizzo di protocolli sperimentali differenti per le misurazioni effettuate che determinano di conseguenza un comportamento elettrico variabile [30]. Per questo motivo affermati modelli di miociti cardiaci, vincolati a dati sperimentali, spesso non si rivelano adeguati nello studio di nuovi fenomeni. Infatti, variando i dati, i modelli diventano inadeguati non essendo costruiti su informazioni conosciute.

Un punto chiave sul quale i miociti cardiaci differiscono è l'esatto valore delle massime conduttanze ioniche, le quali determinano il flusso massimo di ioni attraverso la membrana cellulare. Questa variabilità porta sia a differenti morfologie

del potenziale di azione, sia a differenti durate dello stesso potenziale d'azione (APD) mentre batte allo stesso **base cycle length**; questa misura rappresenta l'intervallo di tempo che intercorre tra la comparsa di un'onda di potenziale d'azione e il verificarsi di un nuovo stimolo che produce l'onda successiva; in altre parole la durata di stimolazione elettrica della cellula cardiaca in un singolo ciclo. È l'inverso della frequenza di stimolazione. I valori massimi delle conduttanze sono proprio i parametri scelti per i seguenti modelli; essi sono influenzati da molteplici fattori quali la densità dei canali ionici, la geometria della membrana cellulare, la variabilità genetica che porta alle differenze strutturali e infine dalla regolazione stessa di questi canali.

Dopo questa introduzione, saranno ora affrontati nel dettaglio i primi due obiettivi dello studio.

4.4.1 PRIMO OBIETTIVO: STUDIO DI SENSIBILITÀ DEL MODELLO

Il primo obiettivo consiste nello studio di sensibilità di modello. Vengono variate singolarmente le conduttanze di un modello matematico (i parametri) per capire quanto queste influiscano sulla morfologia del potenziale d'azione, il fenotipo. Per questo studio è stato selezionato il modello cellulare ventricolare di Luo-Rudy (LR1), derivato originariamente dal modello Beeler Reuter (BR), perché riproduce in modo verosimile le componenti chiave della morfologia del potenziale d'azione rilevato sperimentalmente. Un altro vantaggio di questo modello consiste nella sua capacità di convergere ad una situazione di regime nell'arco di pochi battiti, mentre per modelli più complessi o successivi, come il Luo-Rudy Dynamic (LRd)[31] possono occorrere decine di battiti. Il modello LR1 utilizza le formulazioni di Hodgkin Huxley per le correnti ioniche, ove le cellule sono modellate come un circuito con rami paralleli per ogni tipologia di canale ionico. Come “marcatore” di una eventuale variazione di potenziale d'azione si è optato per la **curva di restituzione**, la quale mostra il recupero della membrana cellulare ad un potenziale di riposo in funzione di diversi BCLs (quindi a diverse frequenze di battito) e della durata del potenziale d'azione (APD).

Per l'analisi di sensibilità del LR1 i valori nominali di massima conduttanza, che rappresentano i parametri del modello, sono stati traslati del $\pm 10\%$. Successivamente vengono tracciate le curve di restituzione ai valori di regime, i grafici in figura 4.6 sono stati ottenuti in seguito alle variazioni dei parametri g_{Na} , g_{si} , g_K , g_{K1} , g_{Kp} .

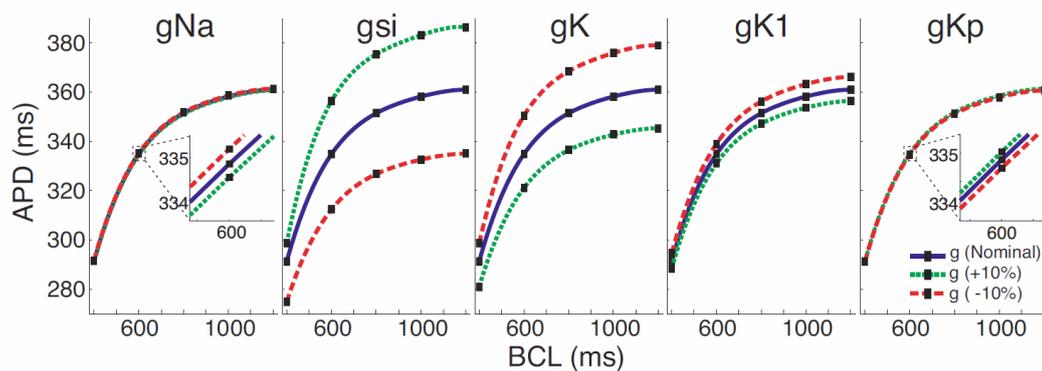


Figura 4.6: Curve di restituzione per modelli LR1 con i massimi valori di conduttanza variati separatamente. Le curve con i valori di conduttanza incrementati del $+10\%$ e -10% sono rispettivamente indicate in verde e rosso. In blu è indicata la curva nominale del modello. Le curve sono state tracciate sovrapponendo varie esecuzioni con diverse BCL, partendo da 1200 ms fino a raggiungere 400 ms a passi di 200ms.[28]

I grafici sono stati ottenuti ricavando i dati da diverse curve a diversi prestabiliti BCLs, decrementando da 1200 ms a 400 ms a passi di 200 ms. In questo modo, eseguendo diverse volte il modello con i parametri delle conduttanze variati di volta in volta, si è posto in evidenza come essi possano influire sulla durata del potenziale d'azione.

Come visto in figura 4.6, il modello LR1 è meno sensibile al cambiamento di g_{Na} e di g_{Kp} e, invece, maggiormente al cambiamento di g_{si} . I cambiamenti di g_K e di g_{K1} producono un impatto intermedio sulla curva di restituzione quando comparati ai cambiamenti dovuti alle altre conduttanze.

La bassa sensibilità di g_{Na} nella restituzione è comprensibile in quanto quel parametro è tipicamente associato alla prima fase di upstroke del potenziale d'azione e ne determina la velocità, quindi non ha particolare incidenza sulla durata del

potenziale d'azione. Il plateau invece, la fase che più influisce sulla APD, è mediato in larga parte dal calcio, il quale è rappresentato da g_{si} . Quanto detto è evidente in figura 4.7: qui sono mostrate le correnti al posto delle conduttanze. Il ragionamento è analogo in quanto un'alta conduttanza al sodio determina una bassa resistenza al passaggio di questi ioni e di conseguenza un passaggio agevolato per la corrente.

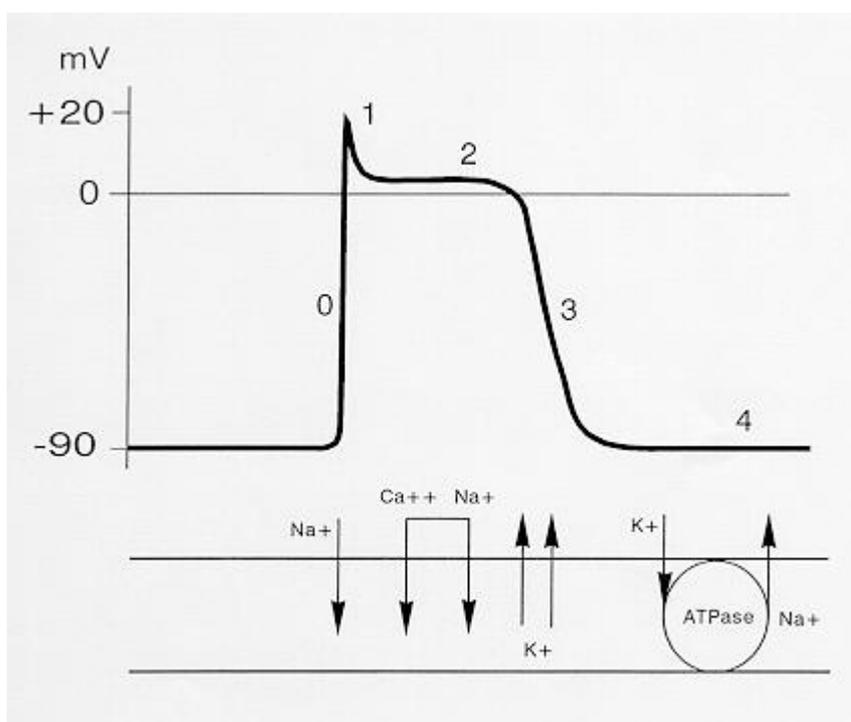


Figura 4.7: Fasi del potenziale d'azione e relative correnti principali[32]

In conclusione l'analisi di sensibilità di modello effettuata in questo studio ha indicato che la morfologia del potenziale di un cardiomiocita ventricolare, strettamente legata alla sua durata e quindi alla possibilità di formazione del plateau, è in gran parte dovuta alle correnti del calcio. Perturbazioni singole di questi parametri (le conduttanze) nell'analisi della sensibilità portano a differenti fenotipi, con conseguenze di grande o piccolo impatto sulla curva di restituzione. La curva, basata sulla durata del potenziale d'azione è stata selezionata come "marcatore" dell'incidenza di queste conduttanze in quanto molte patologie aritmiche come le alternans possono manifestarsi proprio come variazioni dell'APD. Una volta stabilita la risposta della curva alla variazione dei parametri, quelli ritenuti più incidenti possono essere trattati con priorità rispetto a quelli meno influenti. Oltretutto, quei parametri la cui variazione non comporta particolari modifiche della curva di

restituzione possono essere riconsiderati nella formulazione stessa del modello. Se la loro influenza è trascurabile la loro presenza rappresenta un appesantimento inutile del calcolo. In aggiunta, la sensibilità a un parametro può avere implicazioni riguardo al dosaggio in trattamenti farmacologici, in quanto alcuni canali ionici contribuiscono in misura minore all'obiettivo del trattamento.

4.4.2 SECONDO OBIETTIVO: UTILIZZO DI UN ALGORITMO GENETICO PER LA RIPRODUZIONE DI POTENZIALI D'AZIONE NOMINALI AFFETTI DA ALTERNANS

Per questa seconda parte è stato utilizzato un algoritmo genetico per spaziare all'interno dell'ampio spazio dei parametri, potendoli valutare e variare simultaneamente durante la computazione. Lo studio si è posto come obiettivo la determinazione di un set di parametri (le conduttanze ioniche) che meglio fittano un modello nominale di un fenotipo affetto da alternans. L'algoritmo genetico è stato scelto per trovare delle soluzioni a questo problema di ottimizzazione parametrica: il genotipo è rappresentato da un array di valori di conduttanze di un miocita ventricolare cardiaco, il fenotipo è invece rappresentato dal comportamento elettrico, ovvero dalla morfologia d'onda e viene utilizzata una funzione costo che miri a riprodurre il comportamento aritmogenico tipico delle alternans presente nel modello nominale di riferimento. I valori presenti in questi modelli sono solitamente stimati a partire da simulazioni effettuate con modelli già esistenti, come quello di Luo - Rudy (LR1). In questo modello sono state indotte frequenze di battito sufficientemente elevate da favorire l'insorgere delle alternans in quanto i canali ionici prima di completare il recupero del potenziale di riposo vengono già raggiunti dallo stimolo successivo.

Il fenomeno delle alternans è un presunto precursore di aritmie letali[33]. A livello cellulare queste implicano una variazione della durata del potenziale d'azione (APD) un battito dopo l'altro. Per l'algoritmo è stata utilizzata una funzione costo comprendente il fenomeno delle alternans, ovvero una funzione basata sullo scarto quadratico tra un modello affetto da questa aritmia e i vari individui della popolazione dell'algoritmo.

Come detto prima, anche la sola variazione di un parametro (conduttanza) può indurre macroscopici cambiamenti nella morfologia del potenziale. Variandone più di uno contemporaneamente le combinazioni possibili crescerebbero esponenzialmente rendendo impossibile fare “manualmente” tutti i tentativi possibili. Per questo è stato introdotto l’uso degli algoritmi genetici. Essi coprono larghe porzioni dello spazio dei parametri utilizzando computazioni correlate con i processi evolutivi.

In questo studio un individuo è un modello esemplificato, con il genotipo rappresentato da un array di massime conduttanze ioniche e un fenotipo corrispondente al potenziale di membrana cellulare e di conseguenza alla sua morfologia. I genotipi iniziali, quelli per formare la prima popolazione, non possono essere ricavati dai dati sperimentali, l’algoritmo è stato quindi inizializzato con genotipi casuali ricavati dal modello LR1. Le impostazioni per l’algoritmo sono state le seguenti:

- **Selezione** dei genitori tramite selezione a torneo senza riposizionamento, con una dimensione “k” del torneo pari a 2.
- **Crossover** con probabilità $p_c = 0.9$ (quindi non deterministico). Come specifico operatore è stato utilizzato un crossover binario simulato (SBX) con una probabilità di scambio tra i geni “migliori” pari a 0.5 e un indice pari a 10.
- **Mutazione** con probabilità $p_m = 0.1$ e realizzata con un operatore polinomiale di indice $n_m = 20$.
- **Funzione costo** costituita da coppie di potenziali d’azione relativi a tre differenti frequenze cardiache compatibili con le frequenze tipiche delle alternans. Nella funzione costo viene calcolato, istante per istante, la differenza (al quadrato) del potenziale elettrico tra il modello nominale affetto da alternans e il fenotipo figlio appena formato. Questo viene contemporaneamente fatto per tre coppie fenotipo nominale-fenotipo figlio aventi diversi BCL. Questi scarti quadratici vengono poi sommati tra loro e la radice di questa somma rappresenta l’errore. La funzione costo è quindi matematicamente rappresentata dalla seguente formula:

$$E = \sqrt{\sum_{t=t_0}^{lmax} (V_{nominale}(t) - V_{individuo}(t))^2}$$

In figura 4.8 è possibile verificare il funzionamento dell'algoritmo: le tracce continue in A e B rappresentano i potenziali d'azione dei modelli nominali affetti da alternans, in figura A è invece rappresentato il confronto tra questo modello e un fenotipo proveniente dalla prima generazione, ancora pesantemente affetto da errore, in figura B invece viene illustrato lo stesso concetto con un individuo dell'ultima generazione: l'errore si è quasi annullato e le curve coincidono.

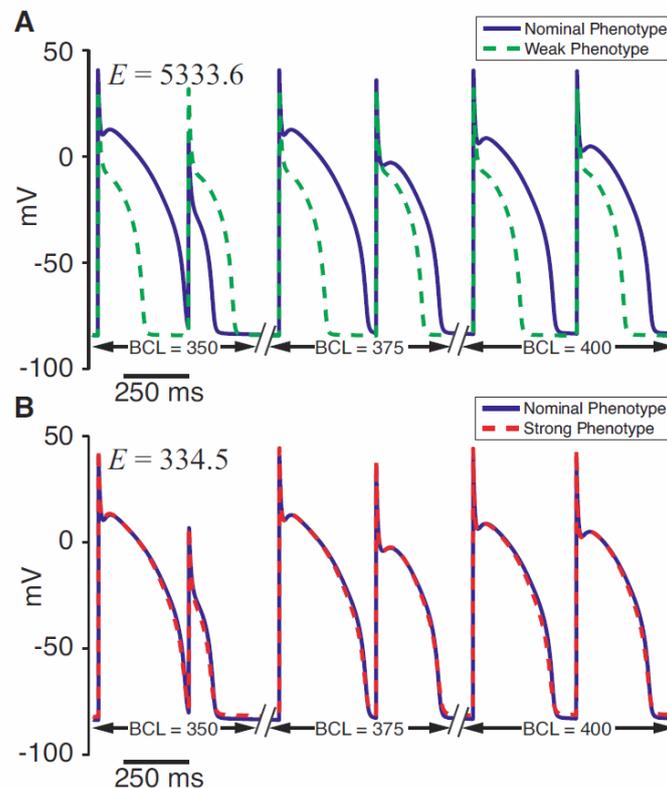


Figura 4.8: Comparazione tra i fenotipi dell'algoritmo e quelli nominali affetti da alternans: (A) Confronto con un individuo proveniente dalla prima generazione; (B) Confronto con individuo proveniente dall'ultima generazione [28]

In Figura 4.9 in alto è possibile osservare il progresso graduale dell'algoritmo: si può notare, come menzionato nel secondo capitolo, come vi sia un netto miglioramento

concentrato nella prima metà dell'esecuzione. La successiva metà è caratterizzata da un miglioramento più esiguo. In basso invece viene mostrato come durante la progressione dell'algoritmo genetico l'errore del miglior individuo e l'errore medio della popolazione siano decresciuti.

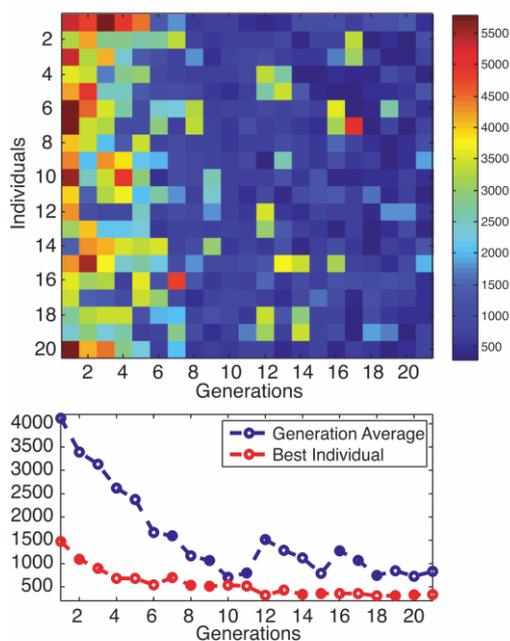


Figura 4.9: Progressione dell'algoritmo genetico: (Sopra) Evoluzione dalla popolazione originale a quella finale; la barra colorata indica l'errore del singolo individuo rispetto al modello nominale. (Sotto) Errore medio di popolazione e del miglior individuo generazione per generazione. [28]

Per l'implementazione dell'algoritmo è stato utilizzato il Toolbox degli algoritmi genetici dell'università dell'Illinois [34], con una variazione possibile di parametri del +/- 50% per ogni parametro di massima conduttanza del modello nominale originale.

La dimensione della popolazione è stata impostata a 20 individui con condizione di terminazione fissata al raggiungimento della ventesima generazione. Queste impostazioni si sono rivelate sufficienti per il raggiungimento dell'obiettivo.

La funzione costo viene calcolata per ciascun individuo all'interno della stessa generazione senza essere influenzata dagli altri individui (Questo aspetto verrà reso evidente in figura 4.13 nella prossima sperimentazione). Vi è quindi un parallelismo intrinseco nella natura del calcolo di queste funzioni di fitness, parallelismo che si

adatta particolarmente al calcolo parallelo delle CPU. Per ogni esecuzione dell'algoritmo genetico è stato utilizzato OpenMP [35] per distribuire a thread di calcolo diversi fenotipi e calcolo di fitness di ogni individuo di una generazione. Questi thread vengono calcolati in parallelo fino a ricollegarsi una volta giunti al termine, ovvero al completamento dell'elaborazione relativa ad una generazione. Successivamente questi thread si dividono nuovamente dopo le operazioni di selezione, crossover e mutazione. È questo parallelismo che ha portato ad optare per gli algoritmi genetici, in quanto la valutazione di un singolo individuo avviene nell'ordine di minuti.

La perturbazione multipla e contemporanea dei parametri condotta dall'algoritmo genetico ha portato a un FIT ottimale di una funzione costo con alternans, un precursore di alcune aritmie cardiache. Minimizzata questa funzione (che ricordiamo rappresenta l'errore) si è ottenuto il set di parametri desiderato.

4.5 TRASFORMAZIONE IN SILICO E IN VITRO DEL POTENZIALE D'AZIONE

Per studiare le relazioni che intercorrono tra differenti specie ed aree del cuore, è stato utilizzato un algoritmo genetico per determinare se effettivamente il comportamento elettrico di un miocita possa essere trasformato in quello tipico del miocita di un'altra specie o di un'altra regione cardiaca, nonostante le iniziali differenze nella morfologia del potenziale d'azione.

Di seguito verranno analizzati due approcci differenti basati sui precedentemente citati studi (Kherlopian et al. [28], Bot et al. [36]), entrambe focalizzati sulla trasformazione del potenziale d'azione inter-specie:

1. Nel primo caso, affrontato nello studio di Kherlopian et al., un modello di miocita atriale umano, conosciuto in letteratura, viene trasformato *in silico* tramite un algoritmo genetico al fine di fittare il comportamento elettrico di un miocita ventricolare appartenente a una specie diversa. Questa trasformazione di modello dimostra le potenzialità di questi algoritmi nell'estendere l'utilizzo dei modelli di miocita cardiaco attraverso la comparazione di differenti regioni funzionali del cuore.
2. Nel secondo caso, trattato nel secondo studio, il potenziale d'azione di un miocita murino vivente *in vitro* è stato sottoposto ad antropomorfizzazione. In questa sperimentazione si è fatto un ampio utilizzo di modelli ottimizzati da algoritmi genetici.

4.5.1 TRASFORMAZIONE INTER-SPECIE DI MODELLO TRAMITE ALGORITMO GENETICO.

In questa prima sperimentazione, una volta ricavata sperimentalmente la morfologia del potenziale d'azione ventricolare di un guinea pig[37], si è tentato, tramite algoritmo genetico, di trasformare un modello di potenziale d'azione di un miocita atriale umano in quello ventricolare del guinea pig. Questa sperimentazione ha inoltre messo in evidenza come la modifica delle massime conduttanze dei canali ionici possa tradursi in differenti funzionalità del tessuto cardiaco. Mentre nel precedente sottocapitolo 4.4 veniva utilizzato un approccio esclusivamente computazionale, questa metodologia è basata su un approccio anche sperimentale. Occorre infatti isolare miociti cardiaci ventricolari di guinea pig e ricavare sperimentalmente la loro caratteristica morfologia del potenziale d'azione tramite la tecnica del Patch Clamp. Una volta trattati in maniera opportuna, le cellule sono state sollecitate con onde quadre di 1ms aventi un'intensità pari a 1,5 volte la soglia di innesco del potenziale d'azione a una BCL di 500ms.

Una volta ricavati i dati sperimentali si è proceduto con l'utilizzo del modello di miocita atriale di Nygren, anch'esso basato sulle formulazioni delle correnti ioniche di Hodgkin-Huxley. Questo modello viene utilizzato per popolare, in modo casuale, la prima generazione dell'algoritmo genetico. In questo caso si è optato per popolazioni di 40 individui e condizione di terminazione a 60 generazioni. Il maggior costo computazionale rispetto al caso dell'ottimizzazione parametrica vista precedentemente è dovuto alla maggiore complessità del modelli di Nygren rispetto all'LR1; infatti questo modello presenta più parametri ed equazioni più dettagliate per la gestione degli ioni intracellulari.

Le impostazioni dell'algoritmo sono state le seguenti:

- Range di possibile variazione dei parametri di conduttanza del $\pm 2000\%$ rispetto ai valori del modello nominale;

- **Selezione** a torneo senza riposizionamento, con una dimensione “k” del torneo pari a 2;
- **Crossover** con $p_c=0.9$ (quindi non deterministico). Nello specifico è stato utilizzato un **crossover binario simulato (SBX)** con una probabilità di scambio tra i geni “migliori” pari a 0.5 e indice di 10.
- **Mutazione** con $p_m=0.1$ realizzata con un operatore polinomiale con indice $n_m = 20$.
- **Funzione costo** matematicamente rappresentata dalla seguente formula:

$$E = \sqrt{\sum_{t=t_0}^{lmax} (V_{nominale}(t) - V_{individuo}(t))^2}$$

è la stessa funzione vista precedentemente; in questo caso le tensioni nominali sono riferite al potenziale d’azione di guinea pig ricavato sperimentalmente, ovvero quello che deve essere riprodotto.

In questa sperimentazione[38] viene altresì mostrato come un potenziale d’azione con differente morfologia possa essere trasformato in un altro potenziale d’azione proveniente dalla stessa specie e dalla stessa regione del cuore tramite l’utilizzo di un algoritmo genetico.

Sempre con un algoritmo genetico è stato dimostrato che è possibile estendere questa trasformazione ad altre regioni del cuore e addirittura ad altre specie. In figura 4.10 viene infatti mostrato come, partendo da un modello nominale di miocita atriale umano (Nygren), attraverso l’esecuzione di un algoritmo genetico e la relativa variazione dei parametri di conduttanza ionica, si possa modificare questo modello fino a farlo quasi combaciare con il potenziale d’azione ricavato sperimentalmente da un miocita ventricolare di guinea pig.

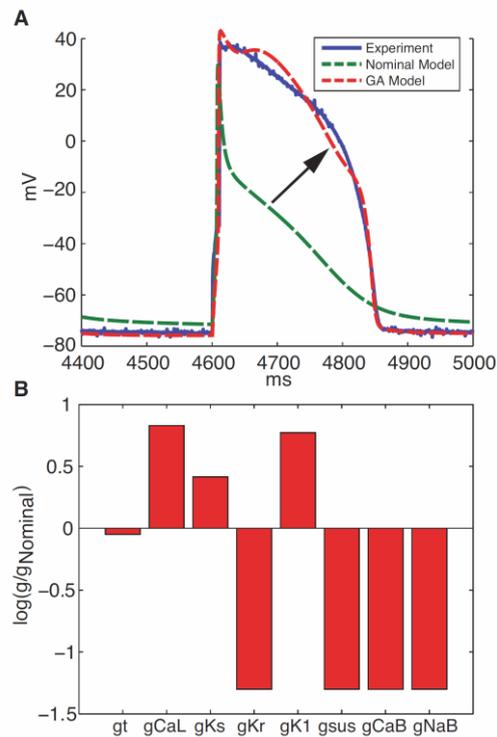


Figura 4.10: Trasformazione di un modello cellulare atriale umano al modello ventricolare sperimentale di guinea pig. (A) Sovrapposizione del modello nominale umano, sperimentale di guinea pig e quello ottenuto tramite algoritmo genetico. La freccia indica la direzione di trasformazione effettuata sul modello di Nygren per fittare la curva sperimentale. (B) Questo grafico a barre mostra le modifiche apportate ai parametri di conduttanza del modello di Nygren per ottenere il fit con la curva sperimentale. [28]

Quindi variando i parametri di un modello sviluppato per una cellula umana si è giunti alla riproduzione di una cellula di un'altra specie appartenente a una diversa regione del cuore. Considerando quest'ultima differenza, ovvero le camere cardiache, risulta concepibile il moderato scarto tra le due curve; infatti atri e ventricoli presentano compiti estremamente differenti e la loro elettrofisiologia presenta alcune differenze non conciliabili totalmente da questa tecnica, probabilmente dovute a parametri che esulano dalle conduttanze ioniche di membrana. Questo è evidente confrontando il fit tra la figura 4.10 (A) e 4.8 (B). Nella parte (B) di figura 4.10 sono invece mostrate le modifiche necessarie nelle conduttanze del modello di Nygren per ottenere questa trasformazione.

4.5.2 ANTROPOMORFIZZAZIONE DI UN CARDIOMIOCITA NEONATALE MURINO

Lo studio delle differenze inter specie dei potenziali d'azione delle cellule eccitabili, ad esempio dei cardiomiociti, ha tratto enorme beneficio dall'evoluzione del Dynamic Clamp. Le differenze tra specie solitamente impongono dei limiti all'applicabilità sull'uomo di studi compiuti su modelli animali. Queste difformità nei potenziali d'azione sono solitamente dovute a variazioni nel livello di espressione dei canali ionici e dei trasportatori e sono particolarmente evidenti confrontando i cardiomiociti umani a quelli murini. Il potenziale d'azione dei topi è sensibilmente più breve e più triangolare rispetto a quello dell'essere umano. Molti farmaci anti aritmici e alcune mutazioni genetiche influenzano il plateau con una depolarizzazione prolungata nell'uomo; siccome proprio questa fase del potenziale d'azione differisce notevolmente tra le due specie, i test effettuati sui topi possono portare a interpretazioni incerte dei risultati. Sostanze che ad esempio inducono ottime risposte sulla dinamica elettrica delle cellule murine possono risultare inefficienti sull'essere umano. Siccome il topo è ritenuto di notevole importanza come modello, una tecnica che permetta di ridurre queste divergenze è vista con grande interesse.

Nel lavoro di Bot et al. viene mostrato come la forma d'onda del potenziale d'azione murino possa essere antropomorfizzata in tempo reale grazie a una nuova tipologia di dynamic clamp detta *cell-type transforming clamp* [39] (CTC). Essa consiste nell'inserimento all'interno della cellula viva di una corrente in grado di compensare le differenze intrinseche tra le correnti ioniche delle due specie.

La CTC utilizza modelli matematici per riprodurre le correnti che generano il potenziale d'azione murino con l'intento di annullare questa corrente per poi rimpiazzarla con quella tipica invece dell'essere umano o delle specie destinataria della trasformazione.

Come precedentemente ricordato, la morfologia e la durata del potenziale d'azione (APD) presentano una certa variabilità da cellula a cellula. Può essere quindi

difficoltoso selezionare a priori un modello matematico adatto che produca un fit soddisfacente rispetto alle caratteristiche d'onda proprie della cellula considerata.

Per ridurre queste differenze in precedenza si era optato per la scelta tra nove possibili modelli in base alla durata del potenziale d'azione del miocita da fittare. Questa metodologia si è però rivelata limitata non riuscendo a riprodurre correttamente un range sufficiente di morfologie di potenziali murini. Nel presente studio viene invece utilizzata una tecnica di ottimizzazione basata su algoritmi genetici, per ottenere un modello specifico efficiente. Questi sono stati in precedenza già usati per studi sui modelli cardiaci ma non si era a conoscenza di altri casi contemporanei a questa sperimentazione nei quali venissero utilizzati direttamente durante l'esperimento, questo per problematiche dovute solitamente all'ampiezza dello spazio dei parametri sul quale l'algoritmo dovrebbe lavorare e quindi sulla sua lentezza nel trovare la convergenza desiderata.

Per ovviare al problema e per rendere l'algoritmo abbastanza rapido da poterlo utilizzare in tempo reale si è deciso di applicarlo alla variazione dei soli parametri-chiave e di ridurre la popolazione iniziale e il numero di generazioni calcolate.

In questo studio è stata utilizzata la tecnica CTC per trasformare il comportamento elettrofisiologico dei miociti di neonati murini in due modelli predeterminati: quello umano e quello del guinea pig. I risultati hanno mostrato come gli algoritmi genetici si siano rivelati i più efficienti nell'elaborare un modello il più possibile simile a quello delle cellule viventi esaminate. Questo modello è poi servito a introdurre le correnti adatte alla cancellazione delle correnti ioniche della cellula e alla loro sostituzione con altre tipiche invece della cellula che si doveva imitare. L'ottimizzazione tramite algoritmo genetico si è rivelata più efficiente di quella della scelta ricordata in precedenza tra i nove possibili modelli candidati, in quanto quest'ultima era basata unicamente su un parametro, la durata del potenziale d'azione. I miglioramenti della performance sono stati evidenti soprattutto durante l'utilizzo del modello umano della cellula.

I singoli miociti ventricolari sono stati isolati da neonati murini di due giorni di vita per via chirurgica ed utilizzati nelle prime 24-48 ore successive alla loro coltura. Le capacità sono state misurate in ogni cellula con il metodo del voltage clamp e

successivamente usate in combinazione con le capacità del modello per modulare le correnti del CTC. I potenziali d'azione sono stati indotti nelle cellule isolate ad una frequenza di 1Hz usando uno stimolo di depolarizzazione di un millisecondo di intensità circa pari a 0.9nA.

CIRCUITO CTC:

In figura 4.11 si può osservare una rapida descrizione del Cell-type Transforming Clamp Circuit.

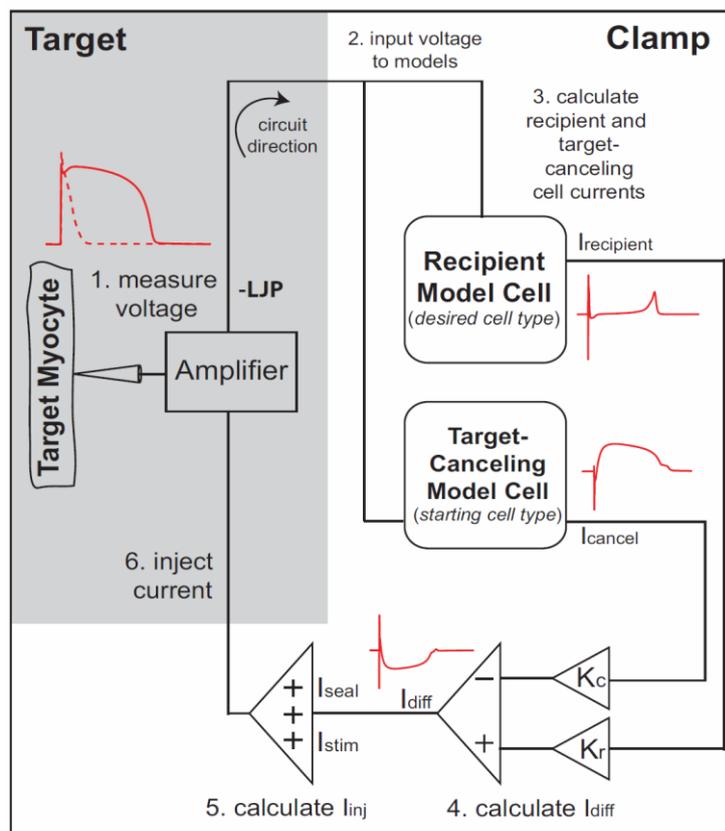


Figura 4.11: Modello CTC: cell-type transforming clamp Circuit [36]

È un circuito ciclico, che ripete continuamente l'inserimento di una corrente tempo-dipendente nel miocita murino. Questa corrente è necessaria a trasformare il comportamento elettrico della cellula attuale in quello desiderato (ad esempio umano o di guinea pig). Nello schema è presente un miocita detto *target*; la cellula vivente "reale" collegata alla CTC, in questo caso il miocita cardiaco murino. Il sopracitato

target viene accoppiato a un “**modello cellulare destinatario**” e un “**modello target di cancellazione**”. Il primo passo di funzionamento consiste nella misurazione del potenziale cellulare della cellula target, il quale viene simultaneamente inviato in ingresso ai due modelli. Il compito di questi è quello di calcolare la corrente totale transmembrana: il modello destinatario calcola la corrente $I_{\text{recipient}}$ corrispondente al tipo di cellula desiderata (umana o di guinea pig); il modello target di cancellazione (ottimizzato dall’algoritmo genetico) stima la corrente transmembrana I_{cancel} della cellula target. Quest’ultima serve proprio a “neutralizzare” la corrente naturale del miocita murino “eliminando” quindi il suo tipico potenziale d’azione. Queste due componenti ($I_{\text{recipient}}$ e I_{cancel}) vengono successivamente scalate in base al rapporto tra le capacità della cellula murina e di quella desiderata (K_c e K_r). Nel passo 4 la corrente differenza, I_{diff} , è calcolata sottraendo la corrente di cancellazione scalata alla corrente scalata del modello desiderato. Alla corrente risultante vengono successivamente addizionate (passo 5) sia una corrente di leakage, utile a compensare delle dispersioni di corrente del circuito stesso, sia la corrente di stimolo necessaria all’induzione del potenziale d’azione. Infine (passo 6) la corrente risultante viene inserita all’interno del miocita reale di partenza e il ciclo ricomincia.

DIFFICOLTÀ NEL SETUP DEL MODELLO TARGET DI CANCELLAZIONE:

I miociti ventricolari murini isolati nella sperimentazione presentano una sensibile variabilità riguardante la morfologia del potenziale d’azione e la sua durata. (Figura 4.12, parte A). Queste differenze hanno reso difficile il matching tra la cellula murina reale e il modello di cancellazione del CTC. La tecnica viene infatti compromessa senza un fit soddisfacente. Nella stessa figura, parte (B) viene mostrato come anche una simulazione di CTC eseguita con una piccola discrepanza di 10ms dell’APD del modello target di cancellazione rispetto alla cellula target porti a un’ incapacità di prolungare in modo appropriato il plateau.

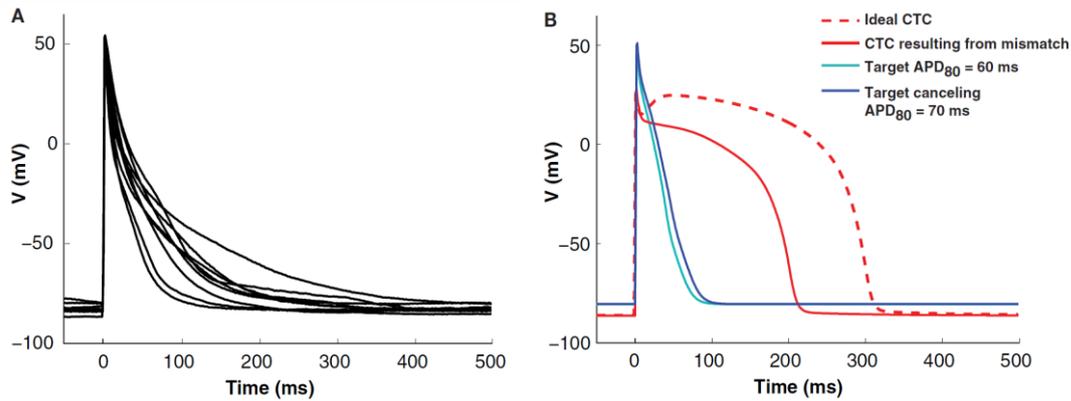


Figura 4.12: (A) Potenziali d'azione mediati su 10 battiti successivi di nove miociti neonatali dello stesso topo. (B) Potenziali d'azione ottenuti in silico utilizzando lo stesso modello neonatale murino (APD_{80} di 60ms - ciano) sia per la cellula target sia per il modello target di cancellazione: la CTC produce una conversione ideale al modello destinatario umano (linea rossa tratteggiata). Se però il modello di cancellazione presenta anche una minima differenza con il comportamento della cellula target (ad esempio un APD_{80} di 70 ms - blu) il risultato della CTC sarà compromesso (linea Rossa continua) [36].

SELEZIONE DI MODELLO BASATA SU TEMPLATE:

Come primo approccio per impostare i parametri del modello di cancellazione (per ottenere un modello che riproduca fedelmente i potenziali d'azione del miocita murino analizzato sperimentalmente) è stata sviluppata una suite di 9 modelli con valori APD_{80} che spaziano da 40 a 120ms a incrementi di 10ms. Questo è stato ottenuto variando la conduttanza di potassio a regime (g_{ss}) e la conduttanza di potassio a lenta inattivazione (g_{Kslow})[20]. Dopo aver generato questi modelli viene scelto il più fedele tra questi a quello sperimentalmente misurato e utilizzato come modello target di cancellazione all'interno della CTC.

CONFIGURAZIONE DEL MODELLO TRAMITE ALGORITMO GENETICO

Come alternativa al metodo basato sui template viene proposto un possibile utilizzo di un algoritmo genetico per estrapolare i migliori parametri delle conduttanze dominanti per l'impostazione del modello target di cancellazione. L'algoritmo, inizialmente implementato in laboratorio[40], è stato successivamente modificato per un'esecuzione abbastanza veloce ma efficiente da essere utilizzato direttamente durante l'esperimento. Come impostazioni specifiche per questo esperimento si è scelto:

Rappresentazione: l'algoritmo è stato inizializzato generando una popolazione di partenza casuale con fenotipi rappresentati, a livello genotipico, da vettori di valori reali di massima conduttanza ionica. Nello specifico g_{Na} , g_{ss} , g_{Kslow} , g_{CaL} , g_{K1} , g_t . I valori stocastici iniziali sono stati ricavati da un modello murino neonata con APD_{80} di 60ms variandone i valori all'interno dei seguenti range:

CONDUTTANZA	Da	A
g_{Na}	-90%	+90%
g_{K1}	-90%	+90%
g_t	-90%	+90%
g_{CaL}	-10%	+10%
g_{ss}	-90%	+200%
g_{Kslow}	-90%	+200%

Con questa configurazione, la ricerca dell'algoritmo genetico è stato in grado di esplorare varie morfologie di potenziale d'azione, con APD da 40 a 160ms.

Selezione: la selezione degli individui dei genitori incaricati di generare la successiva generazione è stata affidata alla selezione a torneo senza riposizionamento. Questo procedimento crea una "mating pool" di dimensioni dimezzate rispetto alla generazione precedente. Il processo di selezione è stato ripetuto una seconda volta in modo che il numero dei genitori nella mating pool sia uguale al numero di individui in ogni generazione.

Crossover (figura 4.13): i genitori presenti nella mating pool sono stati accoppiati in modo sequenziale seguendo l'ordine casuale con il quale avevano precedentemente vinto i rispettivi tornei. Ogni coppia di genitori produce due figli e la maggior parte di essi viene è stata sottoposta a crossover (con probabilità $p_c=0.9$). La tipologia di crossover utilizzata in questo studio è la tecnica di **simulated binary crossover** (SBX) con un indice pari a 10 e una probabilità di scambio del singolo parametro migliore (genewise) di 0.5.

Mutazione (figura 4.13): successivamente, sia i genotipi sottoposti a crossover sia i genitori non modificati sono stati sottoposti a mutazione. Per la mutazione si è optato per un operatore polinomiale con indice 20, centrato sui valori correnti dei parametri degli individui. La probabilità delle mutazioni, p_m è stata impostata a 0.1.

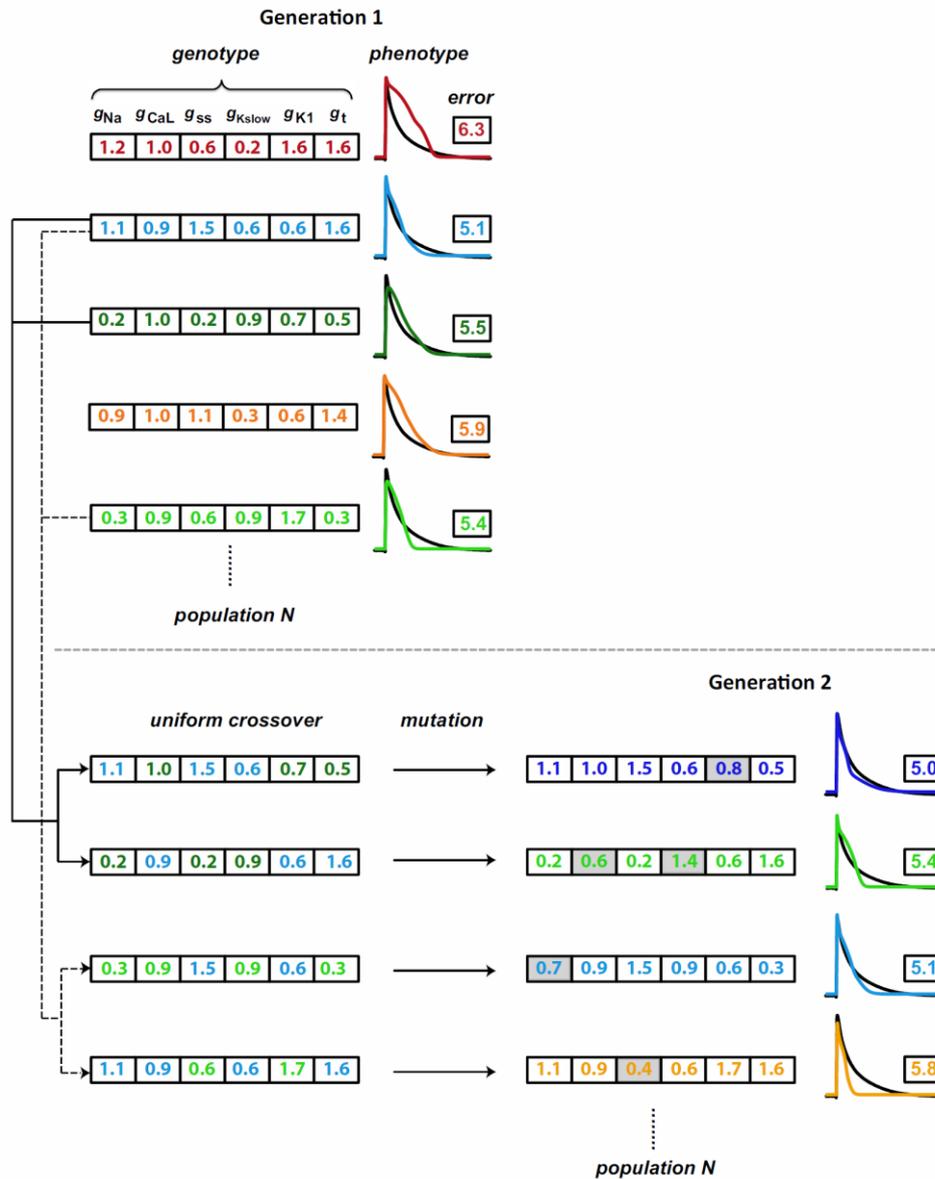


Figura 4.13: Progresso dell'algoritmo genetico. Il genotipo degli individui è rappresentato da un vettore contenente i valori (alleli) corrispondenti a sei diverse conduttanze (geni). Alla loro sinistra è rappresentato il relativo fenotipo, ovvero la forma d'onda. La traccia nera in ogni grafico rappresenta il potenziale d'azione "obiettivo", ovvero quello della cellula target. La figura mostra anche i già citati metodi di crossover e mutazione. Questo processo, qui indicato fino alla seconda generazione per una popolazione esemplificativa di soli 5 individui, termina dopo 15 generazioni. [36]

Sostituzione: nell'ambito della sostituzione si è ricorso alla strategia dell'**elitarismo** con la quale, ricordiamo, il miglior individuo di ogni generazione viene direttamente copiato nella generazione successiva.

Valutazione: il potenziale di riposo di membrana è stato misurato precedentemente a ogni potenziale d'azione e lo stesso è stato fatto nell'istante precedente all'inserimento dello stimolo elettrico esterno. Sia la durata del potenziale d'azione dei miociti, sia quella del modello sono state misurate dal momento dell'upstroke del potenziale d'azione al momento in cui il potenziale è tornato all'80% di ampiezza (APD_{80}), mentre quella in uscita al CTC è stata misurata sempre dall'upstroke fino al 90, 50 e 30% di ampiezza dello stesso potenziale. La funzione costo dell'algoritmo genetico è ricavata dalla somma dei minimi quadrati secondo la seguente formula:

$$SSD = \sum_{t=t_0}^{t_{max}} [V_1(t) - V_2(t)]^2$$

dove V_1 e V_2 rappresentano il potenziale transmembrana del modello da una parte e dei dati sperimentali dall'altra. Questa funzione rappresenta l'errore tra il fenotipo generato dall'algoritmo genetico (ovvero quello del modello target di cancellazione) e quello misurato sperimentalmente nella cellula target. Nel caso dei dati sperimentali è stata utilizzata una forma d'onda mediata e come istante di partenza si è scelto il momento nel quale l'upstroke del potenziale d'azione attraversa i -40mV. Questo è stato fatto per evitare degli artefatti dovuti alla presenza dello stimolo esterno per l'induzione dei potenziali d'azione. La durata del segmento per il calcolo dell'errore è stato impostato a 300ms.

Popolazione e Generazioni: generalmente gli algoritmi genetici sono molto complessi e richiedono un tempo computazionale elevato considerando che tutti i passaggi appena esposti sono stati ripetuti per ogni individuo attraverso numerose generazioni. Per velocizzare questo processo si è agito su tre fronti: restringere lo spazio dei parametri concentrandosi su quelli di maggiore influenza, diminuire il numero delle generazioni portandole a 15 e limitare la cardinalità delle singola generazione a 40 individui. Questi accorgimenti hanno permesso un notevole

alleggerimento dell'algoritmo e la possibilità di portarlo ad ottenere soluzione con errore limitato in circa 13-15 secondi. Per restringere lo spazio dei parametri si è scelto di concentrarsi sui 6 più importanti valori di conduttanza, limitandone oltretutto l'escursione possibile dei valori. Queste conduttanze sono le già citate: g_{Na} , g_{ss} , g_{Kslow} , g_{CaL} , g_{K1} , g_t .

ELABORAZIONE DELL'ALGORITMO:

Si possono seguire le fasi di elaborazione dell'algoritmo genetico in figura 4.14. La generazione iniziale di individui è stocastica, anche se limitata entro un range di valori. Questo ha portato ad un errore relativamente ampio e alla produzione di potenziali d'azione con morfologie differenti da quella desiderata.

Con l'avanzamento dell'algoritmo si può invece notare una progressiva attenuazione dell'errore e un migliore livello di fitness degli individui. Già alla sesta generazione alcuni di essi hanno sviluppato un fenotipo molto vicino all'obiettivo finale. Occorre notare che i parametri sono stati variati in maniera sostanziale dall'algoritmo, come mostrato nella stessa figura (grafici a barre sulla sinistra). Sempre dalla figura 4.14 (in basso a destra) si può osservare come sia l'errore medio di generazione che quello del migliore individuo siano diminuiti celermente con il susseguirsi delle generazioni. Nella sperimentazione è stato scelto, al termine della computazione, il miglior individuo dell'ultima generazione (la quindicesima) elaborato dall'algoritmo.

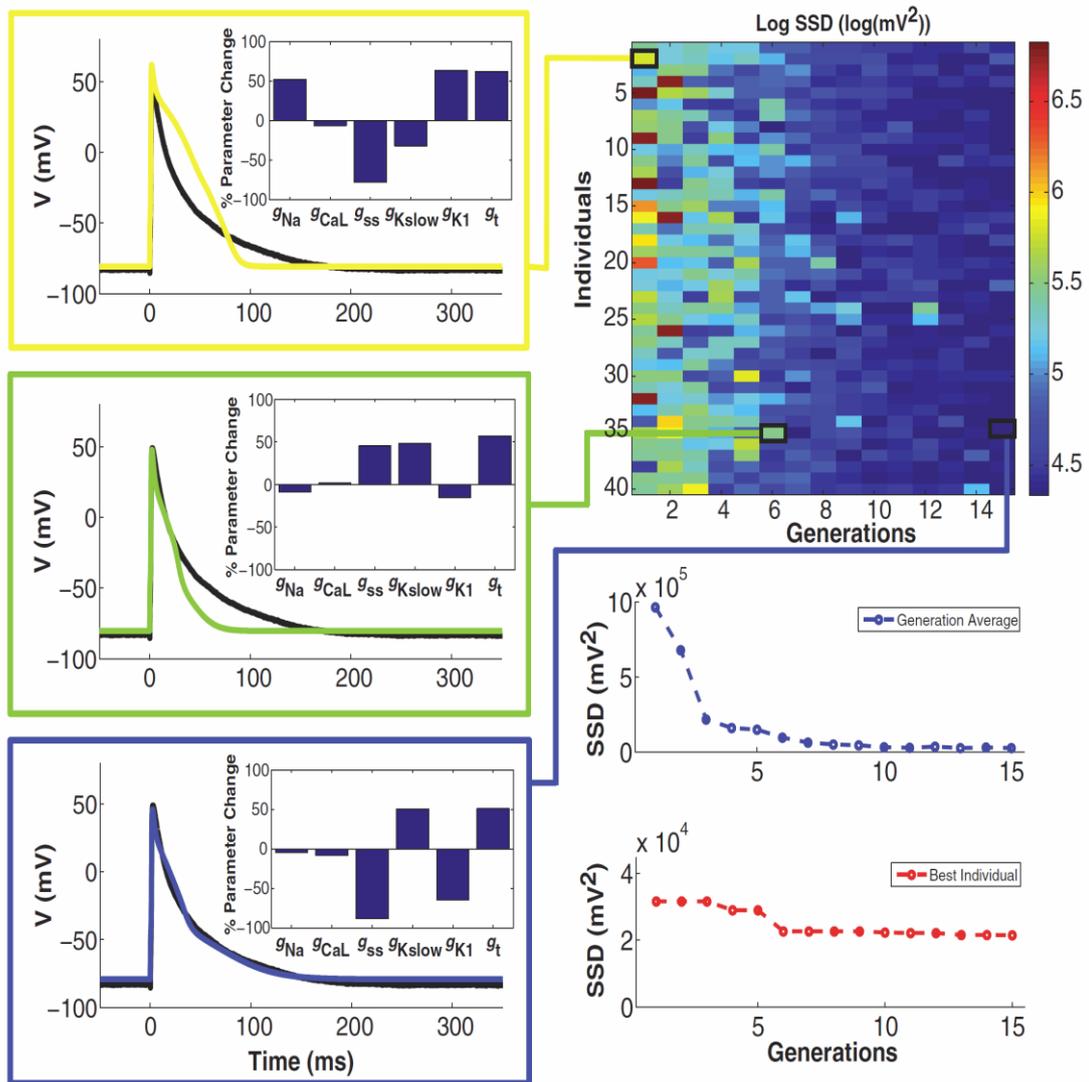


Figura 4.14: Ottimizzazione durante l'esecuzione dell'algoritmo genetico: In alto a destra il progresso dell'algoritmo individuo per individuo con colorazione relativa all'errore; in basso a destra è indicato l'errore medio della media della popolazione e del miglior individuo lungo le generazioni; a sinistra: esempi di genotipi e corrispondenti fenotipi della prima generazione (giallo), sesta (verde) e ultima (blu). La linea continua nera rappresenta sempre il fenotipo della cellula target da fittere.[36]

ESPERIMENTI CTC CON GUINEA PIG COME MODELLO DESTINATARIO:

Per testare l'efficienza della tecnica CTC ne è stata studiata l'abilità nel trasformare in vitro il comportamento di un miocita ventricolare neonatale di topo in uno di guinea pig. Per evidenziarne l'efficacia vengono mostrati sia i risultati ottenuti con un'ottimizzazione basata su selezione da template, sia quelli utilizzando l'algoritmo genetico.

Osservando la figura 4.15 occorre tenere in considerazione la variabilità battito-battito del potenziale d'azione della misurazione sperimentale della cellula target. Per questo motivo è stato opportuno considerare una media su 10 battiti rappresentati dalla linea nera continua. In figura 4.15, parte (A) è stato utilizzato un modello target di cancellazione selezionato da template (linea nera tratteggiata). Nonostante quest'ultimo abbia un APD_{80} vicino al valore medio sperimentale vi sono pronunciate differenze soprattutto nella parte iniziale del potenziale d'azione. Entrato in funzione il CTC, il risultante potenziale d'azione (tracce rosse per una ripetizione di 20 potenziali d'azione consecutivi) si è presentato morfologicamente simile a quello del modello destinatario di guinea pig (tratteggiata nera), ma con una durata decisamente inferiore (figura 4.15(C)).

In figura 4.15(B) invece è mostrato lo stesso procedimento della figura 4.15(A) utilizzando questa volta un modello target di cancellazione ottenuto tramite algoritmo genetico. Si può facilmente notare come le due curve (curva media sperimentale-continua e curva del modello target di cancellazione-tratteggiata) combacino con precisione molto più elevata.

Entrato in funzione il CTC, i risultanti potenziali d'azione (linee rosse) hanno presentato un fit ottimale con il modello destinatario di guinea pig (linea tratteggiata nera) come si può vedere da figura 4.15(D).

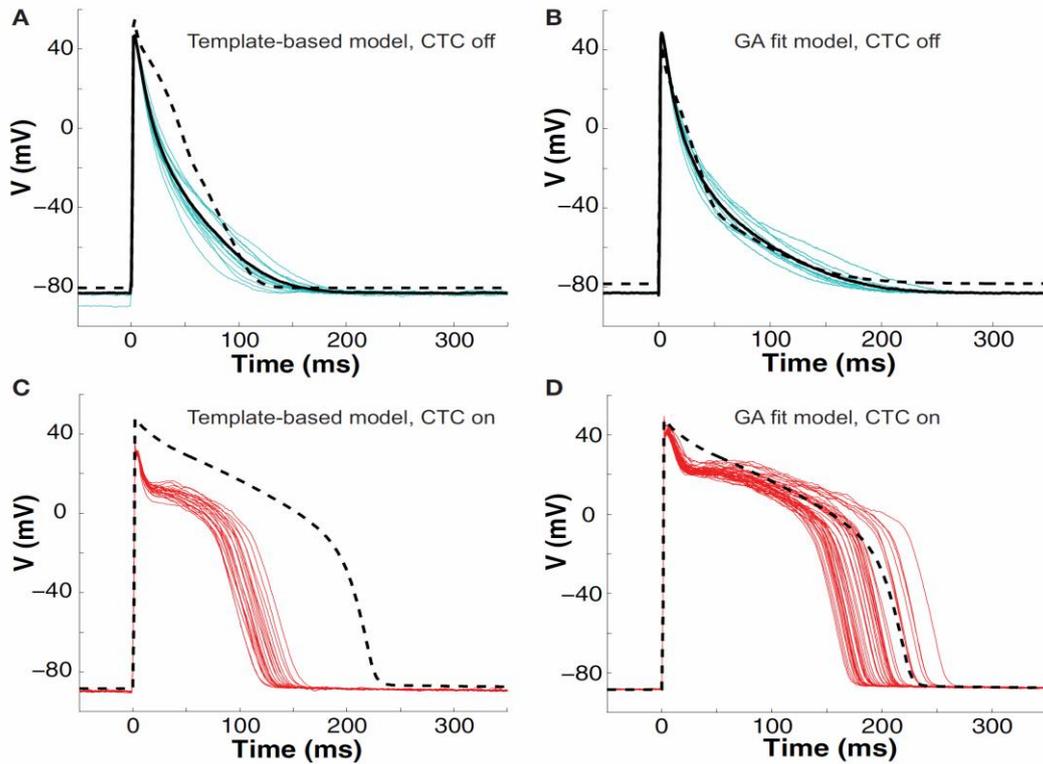


Figura 4.15 Trasformazione da potenziale d'azione neonatale murino a PA di Guinea Pig [36]

I vantaggi di un modello di ottimizzazione rispetto all'altro possono essere quantificati osservando la figura 4.16.

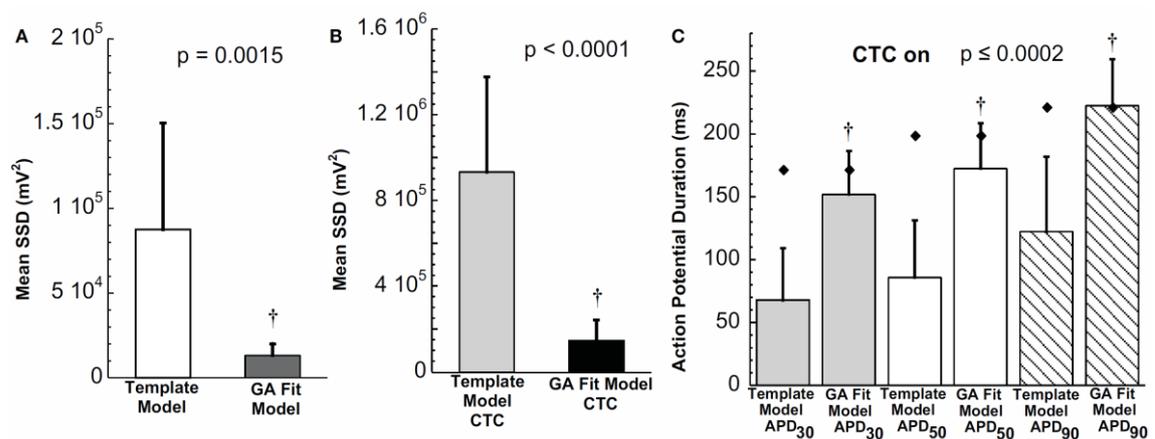


Figura 4.16: Analisi statistica del fitness con il miocita target e performance del CTC [36]

La figura 4.16(A) mostra come, scegliendo un modello target di cancellazione ottenuto con algoritmo genetico (rispetto al template), l'errore medio rispetto alla cellula target misurata in vitro sia drasticamente minore. Nella figura 4.16(B) invece è indicata la differenza dell'errore medio delle due ottimizzazioni (modello target di cancellazione ottenuto con template oppure con algoritmo genetico), combinate questa volta con il CTC attivo. Anche in questo caso il vantaggio apportato dall'algoritmo genetico è risultato evidente. Infine, in figura 4.16(C), sono indicate le varie durate dei potenziali d'azione in relazione a diversi livelli di ripolarizzazione (APD_{30} , APD_{50} , APD_{90}). In tutti e 3 i casi l'ottimizzazione tramite algoritmo genetico si è rivelata decisiva nel prolungare la durata dei potenziali portandola in prossimità di quella delle cellule di guinea pig, obiettivo della sperimentazione.

ESPERIMENTI CTC CON MODELLO DESTINATARIO UMANO

Per investigare ulteriormente le potenzialità della tecnica CTC Bot et al. hanno sottoposto le stesse cellule miocardiche ventricolari neonatali di topo a un'ulteriore trasformazione: questa volta come modello destinatario è stata scelta una cellula miocardica ventricolare umana. Anche in questo si è osservato un grande vantaggio in termini di fitness portato dall'ottimizzazione tramite algoritmo genetico nell'impostare il modello target di cancellazione il più simile possibile ai dati sperimentali. Questo è mostrato in figura 4.17 e 4.18, che rappresentano gli equivalenti di figura 4.15 e 4.16.

L'ottimizzazione tramite selezione di template ancora una volta non ha fornito un risultato soddisfacente (figure 4.17(A, B) e 4.18(A)).

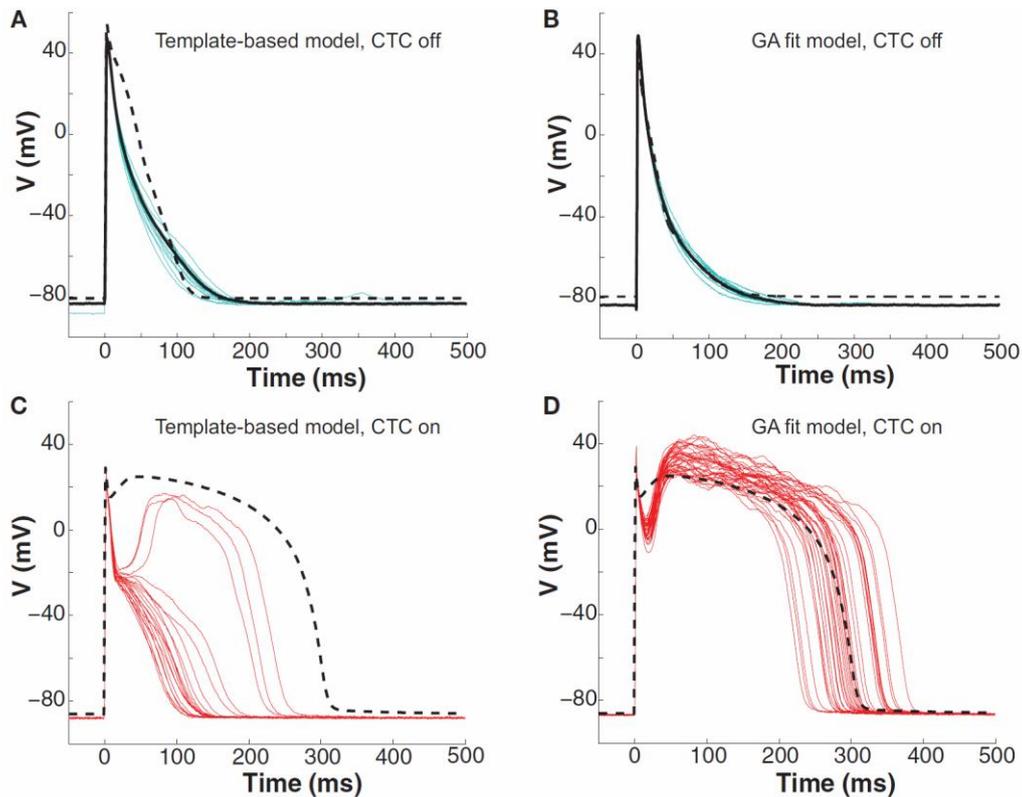


Figura 4.17 Trasformazione da potenziale d'azione neonatale murino a quello umano [36]

Nel caso della cellula umana si può notare una prima ripolarizzazione molto più rapida in confronto a quella di guinea pig. Un'altra differenza è data dalla presenza della caratteristica morfologia “*notch & dome*”, ovvero un piccolo intaglio di ripolarizzazione iniziale seguito da una nuova depolarizzazione a forma di cupola. Anche in questo caso l'utilizzo del binomio CTC-algoritmo genetico ha prodotto un effettivo allungamento in termini di durata del potenziale d'azione e la presenza di un plateau prolungato. E' possibile però questa volta trovare un'imperfezione nella riproduzione del potenziale umano in quanto il risultato tende a mostrare una morfologia “*notch & dome*” troppo marcata (Figura 4.17(D)). A dispetto di questa imperfezione, nelle figure 4.17(D) e 4.18(C) si mostra come la durata del potenziale d'azione antropomorfizzato coincida effettivamente con quella del modello destinatario.

L'ottimizzazione basata su template si è rivelata decisamente fallimentare, soprattutto nella mancata riproduzione del “*dome*” (Figura 4.17(C)). È infatti

possibile notare in figura 4.18(B) una notevole differenza in termini di errore a favore dell'utilizzo dell'algoritmo genetico nella riproduzione di un modello destinatario umano con CTC attivato. Ciò è particolarmente evidente nella fase di ripolarizzazione precoce (APD₃₀ e APD₅₀, Figura 4.18(C)).

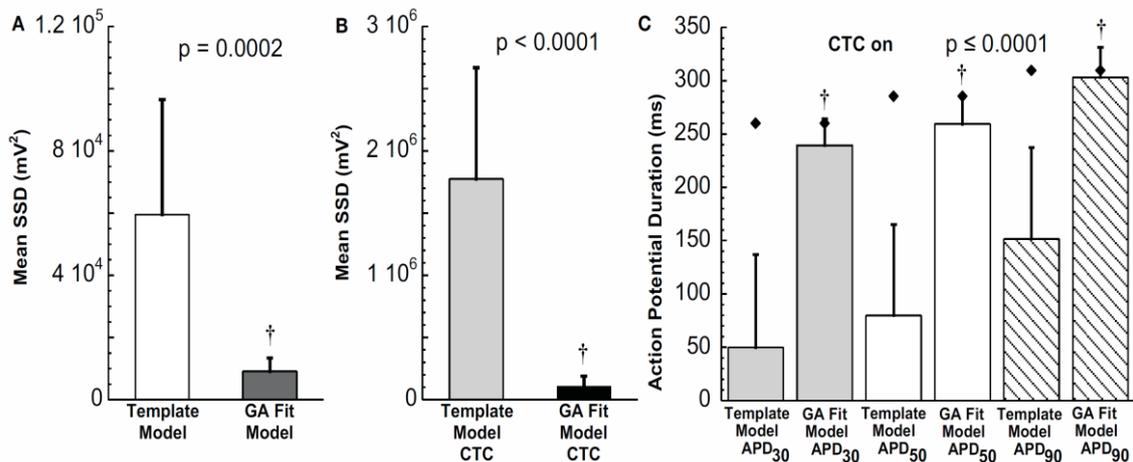


Figura 4.18: Analisi statistica del fitness con il miocita target e performance del CTC [36]

LE DIFFERENZE TRA IL TARGET E IL MODELLO TARGET DI CANCELLAZIONE DIMINUISCONO L'ACCURATEZZA DEL CTC

Dagli esperimenti precedenti è evidente come l'abilità del CTC di riprodurre fedelmente il modello destinatario richieda un'elevata fedeltà tra il miocita target murino e il modello target di cancellazione. Si analizzeranno ora le correnti all'interno del circuito per spiegare dal punto di vista del funzionamento interno il perché il CTC fallisca nel prolungare sufficientemente il potenziale d'azione del miocita quando viene utilizzata una selezione del modello basata sul template. Come aiuto nell'analisi viene simulata una situazione ideale in due parti, rappresentate nella parte sinistra e destra della figura 4.19.

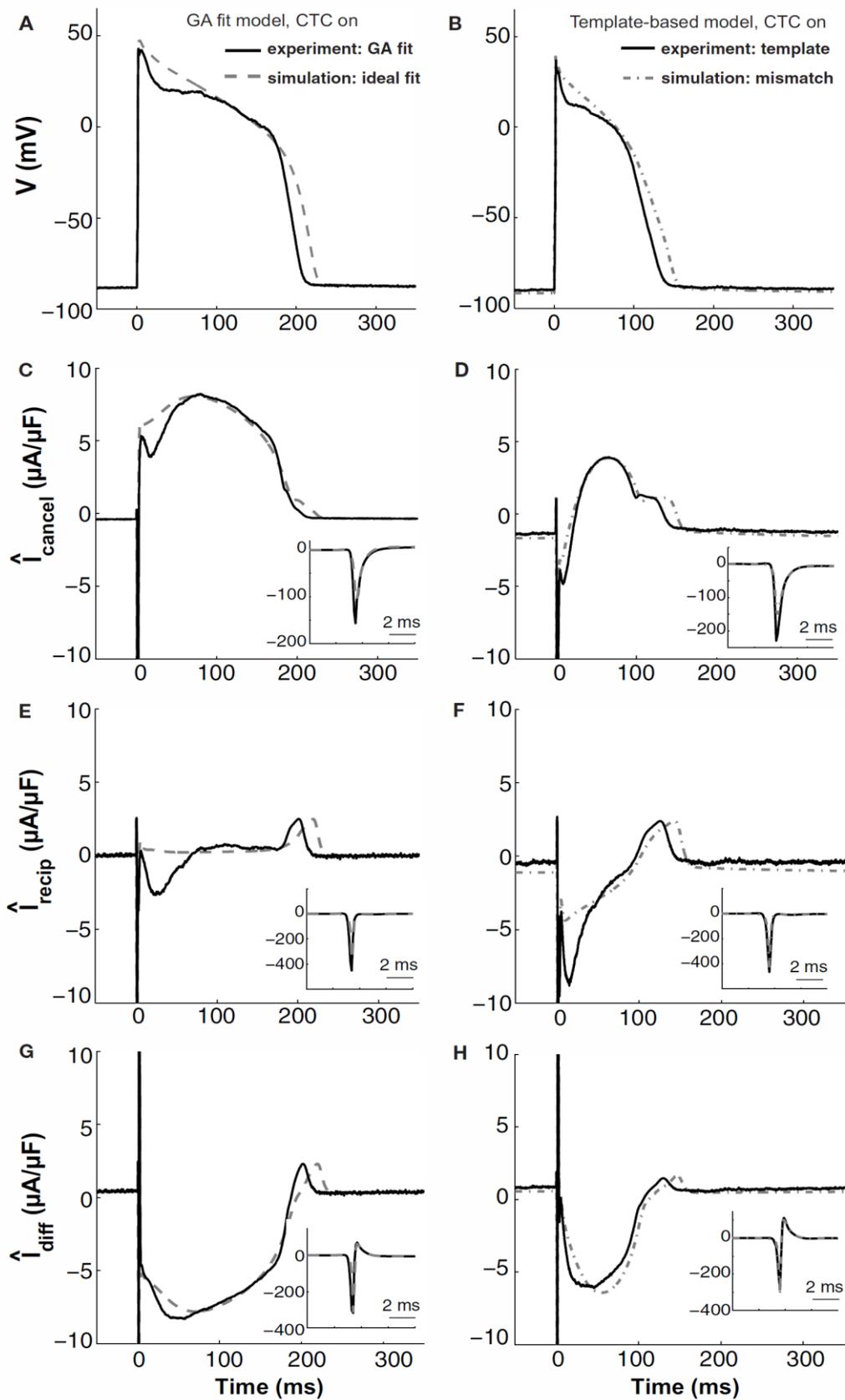


Figura 4.19: Correnti del CTC in silico (linea tratteggiata) e in vitro (continua)[36]

Nel primo caso (a sinistra) sono stati utilizzati i risultati sperimentali di un'esecuzione del CTC con modello target di cancellazione ottimizzato dall'algoritmo genetico (linea continua) in contrapposizione a una simulazione di un'altra esecuzione del CTC nella quale il modello target di cancellazione "cattura" l'esatta morfologia del miocita target, con le stesse correnti. Quest'ultimo è un caso ideale, ed è stato ottenuto utilizzando un modello ottimizzato tramite algoritmo genetico sia sul modello target di cancellazione sia sul miocita target. I risultati dell'esecuzione per la riproduzione del potenziale d'azione del guinea pig sono rappresentati sempre a sinistra dalla linea tratteggiata. Di seguito viene descritto il comportamento delle correnti.

Nel **modello destinatario** (figura 4.19(E)) è presente un ampio spike entrante durante l'upstroke, una piccola componente di correnti in uscita durante la ripolarizzazione precoce in fase due e una fase con corrente in uscita più ampia durante la ripolarizzazione rapida in fase 3.

Nel **modello target di cancellazione** (Figura 4.19(C)) durante la seconda fase vi è un'ampia componente della corrente uscente come attendibile da un modello murino con una veloce ripolarizzazione intrinseca. Siccome la corrente di differenza è data da $\hat{I}_{diff} = \hat{I}_{recipient} - \hat{I}_{cancel}$, dove \hat{I} indica la corrente normalizzata rispetto alla capacità, si può vedere come un'ampia componente uscente di corrente del modello target di cancellazione combinata con una corrente molto più piccola appartenente al modello destinatario risulti in un'ampia **corrente di differenza** entrante che viene successivamente inserita nella cellula (Figura 4.19(G)), durante la fase 2 del potenziale d'azione trasformato dal CTC. Come rappresentato nella parte sinistra di figura 4.19 i risultati ottenuti sperimentalmente (linea continua) sono assai simili a quelli del caso ideale (linea tratteggiata). Una piccola differenza è evidenziabile nel modello di cancellazione subito dopo l'upstroke del potenziale d'azione (figura 4.19(C)): la parte sperimentale presenta corrente uscente minore. Questa piccola differenza di corrente è dovuta a una ripolarizzazione precoce del miocita target evidenziabile anche nel modello destinatario. Tuttavia, questa ripolarizzazione stimola una corrente entrante nel modello destinatario. (Figura 4.19(E)) che aiuta a creare una corrente di differenza \hat{I}_{diff} simile a quella ideale. Queste due differenze andranno quindi a compensarsi nella corrente di differenza che tornerà a essere

fedele al tracciato ideale come si può evincere dalla figura 4.19(G). Quest'analisi ha permesso di stabilire e di dimostrare come effettivamente un'ottimizzazione tramite algoritmo genetico porti a risultati simili a quelli ideali.

Per completezza, verranno ora mostrati i risultati ottenuti dall'utilizzo del CTC avente modello di cancellazione ottimizzato tramite selezione di template (linee continue, parte destra in figura 4.19). In questo caso è possibile subito notare una differenza significativa tra le correnti del modello di cancellazione – ottimizzato tramite template (figura 4.19(D)) - e quelle del caso ideale (tratteggiata in 4.19(C)).

Le correnti interne del CTC e il potenziale d'azione antropomorfizzato possono essere mostrati efficacemente da una simulazione che imiti fedelmente le condizioni sperimentali; è stato quindi introdotto volontariamente uno scarto tra il miocita target e il modello di cancellazione in questo modo: viene eseguito il CTC con modello target di cancellazione sempre ottimizzato tramite selezione di template e un modello del miocita target ottimizzato da un algoritmo genetico (linea tratto-punto in figura 4.19, destra). La corrente di cancellazione risulta molto più piccola rispetto al caso ideale e addirittura risulta entrante invece che uscente nella prima parte della ripolarizzazione, come possiamo osservare in figura 4.19(D). Queste differenze risultano in un'inadeguata corrente di differenza (figura 4.19(H)) nonostante un aumento della corrente entrante nel modello destinatario (Figura 4.19(F)). Questo si tradurrà nell'incapacità per il CTC di mantenere un plateau sufficientemente depolarizzato (Figura 4.19(B)). Di conseguenza, dato che il modello target di cancellazione non fornisce una corrente uscente sufficiente durante il potenziale d'azione, la componente non compensata uscente di corrente del miocita ripolarizzerà la cellula e comprometterà la conversione. Quest'ultima parte di simulazione dimostra ulteriormente che una differenza anche modesta tra il modello target di cancellazione e il miocita target compromette i risultati del CTC.

CONSIDERAZIONI FINALI SULL'UTILIZZO DI UN'OTTIMIZZAZIONE BASATA SU SELEZIONE DI TEMPLATE NEL CTC

Lo studio ha dimostrato che per un'efficiente esecuzione del CTC le correnti registrate sperimentalmente nel miocita target devono essere della stessa ampiezza ed essere caratterizzate dalla stessa tempo-dipendenza del loro equivalente modello teorico. È stato dimostrato precedentemente come il selezionare un modello da una suite basata su APD₈₀, che ne comprende solamente nove, porti ad errori piuttosto evidenti. Questa tecnica di selezione potrebbe essere migliorata incrementando il numero dei parametri di conduttanza coinvolti nelle variazioni. Così facendo però incrementerebbe in modo critico il numero di template della suite e di conseguenza il tempo impiegato per ricercare il migliore di esso. Occorre anche aggiungere che le cellule neonatali di topo subiscono degli sviluppi repentini[41]. Ad esempio, ripetendo gli stessi studi con cellule di età differente si è registrata una ripolarizzazione iniziale più rapida.

La simulazione svolta inserendo una voluta discrepanza tra il modello del miocita target e il modello di cancellazione (linee tratteggiate nella parte destra di figura 4.19) ha mostrato come nel CTC una carenza di corrente di ripolarizzazione nel modello target di cancellazione porti a una componente non compensata di corrente uscente nel miocita, il quale ripolarizzerà troppo velocemente (figura 4.19(B)). Al contrario una corrente di ripolarizzazione eccessiva nel modello di cancellazione porta alla formazione di potenziali d'azione più lunghi del modello destinatario desiderato (non mostrato).

Quando è stato utilizzato il miocita ventricolare umano come modello destinatario e selezionato il modello con template, i miociti target erano frequentemente e rapidamente ripolarizzati ad un range di voltaggio per il quale si sarebbero depolarizzati e avrebbero formato la caratteristica di *dome* oppure si sarebbero completamente ripolarizzati. (la figura 4.17(C) mostra come nel potenziale d'azione murino si possano verificare questi due tipi di comportamento). Il *dome* o la sua assenza può dipendere sensibilmente dall'intensità della corrente totale disponibile dopo la ripolarizzazione iniziale. Nonostante la corrente iniettata nella cellula target

con CTC non vari molto da battito a battito, può risultare in morfologie del potenziale d'azione e della sua durata particolarmente differenti.

CONSIDERAZIONI FINALI SULL'UTILIZZO DI UN'OTTIMIZZAZIONE BASATA SU ALGORITMO GENETICO NEL CTC

In passato altri studi sono stati compiuti su diverse tecniche di ottimizzazione comprendenti gli algoritmi genetici; queste tecniche erano però specialmente rivolte a modelli neuronali[42] mentre pochi studi si erano concentrati sui modelli di elettrofisiologia cardiaca. Il maggior vantaggio derivante dall'utilizzo degli algoritmi genetici rispetto ai metodi di ottimizzazione tradizionali consiste nel fatto di poter selezionare durante il processo anche soluzioni con un fitness inferiore. Un esempio di questo è disponibile in figura 4.14, dove sia nella 12^a che la 14^a generazione sono presenti individui con valori di fitness inferiore alla media della generazione. Questo apparente “difetto” rappresenta invece la potenziale capacità di uscire da minimi locali nei quali l'algoritmo può essersi bloccato durante la computazione, ovviamente al costo di un tempo di elaborazione prolungato tanto quanto è largo lo spazio dei parametri investigato. Come già citato, per assecondare la necessità di un algoritmo “snello” e veloce per un'esecuzione in real-time si è optato per un numero di 40 individui per generazione su un totale di 15. Ulteriori sperimentazioni hanno mostrato come un numero di individui inferiori a 40 possa portare al potenziale blocco dell'algoritmo in minimi locali. Al contrario, un numero superiore avrebbe inciso in maniera sostanziale sui tempi di computazione senza portare particolari vantaggi al fitness degli individui della generazione finale. Le stesse motivazioni hanno portato alla limitazione dei parametri delle conduttanza ioniche al numero di sei. In ultima analisi la sperimentazione è stata limitata al singolo potenziale d'azione in quanto la creazione di un modello dinamico in grado di investigare su diversi potenziale d'azione, variabili nel tempo, avrebbe richiesto uno studio molto più complesso dovendo includere potenziali d'azione tipici delle diverse frequenze di battito cardiaco. Anche per alcuni valori di potenziale di membrana sottostimati di pochi millivolt, il CTC è stato in grado compensare queste differenze producendo potenziali di membrana dei miociti murini antropomorfizzati molto simili a quelli dei

modelli destinatari (Figure 4.16 e 4.18). L'algoritmo genetico ha mostrato prevalentemente una convergenza a modelli risolutivi con incrementati valori della g_t , la conduttanza della corrente uscente transitoria. Un incremento di quest'ultima causa una più rapida ripolarizzazione.

LIMITAZIONI CTC:

La più ovvia limitazione di questo metodo è dovuta all'intrinseca variabilità battito-battito del potenziale d'azione delle cellule eccitabili; questo crea un'inevitabile discrepanza tra le correnti della cellula e del relativo modello di cancellazione. È stato però dimostrato che applicando la CTC a decine di potenziali d'azione, la durata media di questi ultimi dopo la trasformazione presenta il fit desiderato, ovviamente dopo aver ridotto l'errore medio tramite ottimizzazione con algoritmo genetico. È altresì importante la determinazione esatta delle capacità misurate nella cellula, in quanto la loro imprecisione scalerebbe in modo erroneo le relative correnti. Un'altra limitazione del CTC degna di nota è la ridotta capacità di una fedele riproduzione della prima fase del potenziale d'azione del modello destinatario. Questo è particolarmente evidente nel caso della rappresentazione del miocita umano in quanto, come già detto, si assiste a un'eccessiva riproduzione della caratteristica morfologia “*notch-and-dome*”. È quindi consigliabile utilizzare questa tecnica per studiare le fasi successive del potenziale d'azione, le quali sono comunque implicate con maggiore frequenza nella aritmogenesi.

CONSIDERAZIONI FINALI SULLE TRASFORMAZIONI DI POTENZIALE D'AZIONE INTER-SPECIE:

Come mostrato dalle due precedenti sperimentazioni, la trasformazione cellulare inter-specie è importante perché diverse specie offrono diversi vantaggi e svantaggi nella ricerca sulle aritmie. Per esempio, i guinea pig sono utilizzati come modello per le patologie umane, mentre per il topo sono disponibili un'ampia varietà di tecniche genetiche. Nella prima trasformazione è stato mostrato che un crossover tra specie, come uno tra diverse regioni cardiache, è possibile grazie all'utilizzo di un algoritmo

genetico; per questo esso rappresenta un potente mezzo per lo studio dell'elettrofisiologia cardiaca.

Il topo rappresenta una risorsa estremamente importante per le ricerche biologiche, specialmente come detto sopra per le abilità acquisite negli anni nella manipolazione del suo genoma. Queste tecniche si stanno evolvendo rapidamente e il CTC rappresenta un ulteriore strumento di estrema utilità per monitorare i vari fenotipi delle cellule eccitabili sottoposte ad esempio a mutazioni. Nel caso specifico dello studio sulle aritmie cardiache la seconda trasformazione inter-specie in vitro del potenziale d'azione che è stata mostrata può permettere di superare le difficoltà intrinseche nella traduzione dell'elettrofisiologia e della patofisiologia murina in quella umana. Nello studio di Bot et al. è stato dimostrato che il potenziale d'azione di un miocita ventricolare neonatale murino può essere convertito in uno, sempre ventricolare, di guinea pig o di essere umano attraverso la tecnica del CTC. È stato altresì descritto un metodo per una riproduzione efficiente tramite modello di una cellula vivente basato su una ottimizzazione con algoritmo genetico. Inoltre un modello così specifico porta al miglioramento dell'abilità del CTC nell'antropomorfizzare il potenziale d'azione del miocita murino.

L'utilizzo di un ottimizzazione in real-time tramite algoritmi genetici è teoricamente applicabile ad altre cellule eccitabili. Strategie di calcolo evolutive sono già state utilizzate per lo studio di reti neurali pre-registrate^{[1][2][3]}. Questa tecnica risulterebbe altresì utile non solo alle trasformazioni inter-specie ma anche a quelle intra-specie, ad esempio tra cellule provenienti da diverse zone del cuore oppure a differenti stadi di sviluppo.

CONCLUSIONI

Lo studio appena concluso si è proposto come una trattazione sugli algoritmi genetici. Attraverso la ricerca bibliografica si è ricercata una linea storica di sviluppo, una descrizione accurata delle caratteristiche di funzionamento e degli operatori più comuni da esso utilizzati. La ricerca ha mostrato come questa disciplina non sia nata ex-novo ma come invece sia il risultato di tanti studi separati connessi da una base comune (il concetto di algoritmo legato all'evoluzione naturale) riunitisi nel corso degli anni fino a formare una realtà affermata caratterizzata dalle proprie riviste di divulgazione scientifica e dalle proprie conferenze dedicate.

Un ulteriore studio bibliografico ha permesso di individuare ed enunciare alcuni dei molteplici utilizzi degli algoritmi genetici sviluppatasi soprattutto nell'ultimo decennio nell'ambito della bioingegneria. Oggi questi algoritmi rappresentano uno strumento affermato per l'ottimizzazione parametrica e per la risoluzione di problemi di elevata complessità computazionale. Trovano ampio utilizzo anche nella classificazione di tessuti patologici e non, attraverso l'analisi delle bioimmagini; vengono impiegati nel design di protesi scheletriche, nell'ottimizzazioni di sistemi robotici automatizzati per la riabilitazione e in numerosi altri campi.

L'analisi delle sperimentazioni ha mostrato come un algoritmo genetico possa essere utilizzato per l'identificazione parametrica di un modello di potenziale d'azione cardiaco ventricolare affetto da alternans. La ricerca è di particolare interesse se correlata con l'incidenza sulla mortalità globale delle patologie aritmiche cardiache. I risultati di questa sperimentazione ci forniscono un set di parametri (conduttanze ioniche) tipici della manifestazione di queste aritmie. Queste conduttanze determinano, all'interno del modello, la morfologia del potenziale d'azione e l'algoritmo, spaziando velocemente ed efficientemente su un vasto spazio di parametri ha valutato un numero di soluzioni estremamente elevato, riuscendo infine a produrne una ottimale. I parametri di conduttanza ricavati potranno essere in futuro utilizzati all'interno di altri modelli per simulare varie situazioni, ad esempio patologiche, e sperimentare possibili soluzioni per via computazionale non sempre percorribili clinicamente.

Nell'ambito della trasformazione del potenziale d'azione inter-specie si è mostrato come l'algoritmo genetico abbia trasformato efficacemente il potenziale d'azione sia *in silico* che *in vitro* in quello di un'altra specie e di un'altra regione cardiaca. Queste trasformazioni si rivelano particolarmente utili in quanto solitamente diverse specie animali utilizzate nella sperimentazione presentano diversa utilità e diverse tecniche di manipolazione. Ad esempio come specie utilizzate nelle sperimentazioni analizzate (oltre ai modelli umani) sono proprio state scelte il guinea pig (utilizzato frequentemente come modello di patologie umane) e il topo, per il quale è disponibile un'ampia varietà di tecniche genetiche.

Nell'ultimo studio affrontato, infine, permettendo la trasformazione del comportamento elettrofisiologico di un miocita murino in quello umano, l'algoritmo genetico in combinazione con la tecnica CTC introdotta sempre in questo lavoro, si presenta come un efficiente strumento per lo studio di molte applicazioni elettrofisiologiche, dall'analisi delle conseguenze di variazioni genetiche allo screening degli effetti di vari tipi di farmaco.

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO 1:

[1] <http://evolution.berkeley.edu/evosite/evo101/VIIC1aComplexNovelties2.shtml>

[2] <http://um2017.org/faculty-history/faculty/john-h-holland>

[3] http://it.wikipedia.org/wiki/Algoritmo_genetico

Kenneth A. De Jong, Evolutionary Computation - A Unified Approach, A Bradford Book, The MIT Press

A.E. Eiben and J.E. Smith, Introduction to Evolutionary Computing - Springer, Natural Computing Series

CAPITOLO 2:

[1] A.E. Eiben and J.E. Smith, Introduction to Evolutionary Computing, Springer, Natural Computing Series

[2] Burke, Edmund K., and Graham Kendall, eds. Search methodologies: introductory tutorials in optimization and decision support techniques. Springer, 2005.

[3] Deb, Kalyanmoy, and Debayan Deb. "Analyzing Mutation Schemes for Real-Parameter Genetic Algorithms."

[4] Hamdan, Mohammad. "On The Disruption-Level Of Polynomial Mutation For Evolutionary Multi-Objective Optimisation Algorithms." Computing and Informatics 29.5 (2012): 783-800.

[5] http://soihub.org/wiki/index.php/Evolutionary_Algorithms

[6] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Computational.science.Genetic.algorithm.Crossover.Two.Point.svg>

[7] Complex Systems 9 (1995) 431-454 Real-coded Genetic Algorithms with Simulated Binary Crossover: Studies on Multimodal and Multiobjective Problems
Kalyanmoy Deb Amarendra Kumar Department of Mechanical Engineering, Indian Institute of Technology, Kanpur, UP 208 016, India

[8] Agrawal, Ram Bhusan, Kalyanmoy Deb, and Ram Bhushan Agrawal. "Simulated binary crossover for continuous search space." (1994).

CAPITOLO 3:

[1] Pei, Y., et al. "Robot-aided rehabilitation task design for inner shoulder muscles." Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2012 Annual International Conference of the IEEE. IEEE, 2012.

[2] Ishida, Toshimasa, et al. "Use of a genetic algorithm for multiobjective design optimization of the femoral stem of a cemented total hip arthroplasty." Artificial organs 35.4 (2011): 404-410.

[3] Lee, Chungki, et al. "Individual optimization of EEG channel and frequency ranges by means of genetic algorithm." Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2012 Annual International Conference of the IEEE. IEEE, 2012.

[4] Li, Shao-Xin, et al. "Detection of nasopharyngeal cancer using confocal Raman spectroscopy and genetic algorithm technique." Journal of biomedical optics 17.12 (2012): 125003-125003.

[5] Tang, M. T., et al. "A preliminary study of beam weight optimization of intensity-modulated radiation therapy with genetic algorithm]." Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University 26.4 (2006): 456.

[6] Güler, İnan, Hüseyin Polat, and Uçman Ergün. "Combining neural network and genetic algorithm for prediction of lung sounds." Journal of Medical Systems 29.3 (2005): 217-231.

[7] Sarikaya, S., G-W. Weber, and Y. S. Doğrusöz. "Combination of conventional regularization methods and genetic algorithm for solving the inverse problem of

electrocardiography." Health Informatics and Bioinformatics (HIBIT), 2010 5th International Symposium on. IEEE, 2010.

[8] Scarle, S., and R. H. Clayton. "Initiation of re-entry in an excitable medium: Structural investigation of cardiac tissue using a genetic algorithm." *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science* 16.3 (2006): 033115-033115.

CAPITOLO 4:

[1] http://it.wikipedia.org/wiki/Potenziale_d'azione

[2] Bertil Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer

[3] www.lacellula.net/appunti/fisiologia_umana/attivita_elettrica_delle_cellule_di_lavoro.html

[4] Understanding cardiac alternans: the answer lies in the Ca²⁺ store. Sipido KR. *Comment on Circ Res.* 2004 Mar 19;94(5):650-6. PMID: 15031268;

[5] Euler DE. Cardiac alternans: mechanisms and pathophysiological significance. *Cardiovasc Res.* 1999;42:583–590.

[6] Blatter LA, Kockskamper J, Sheehan KA, Zima AV, Huser J, Lipsius SL. Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes. *J Physiol.* 2003;546:19–31.

[7] Walker ML, Rosenbaum DS. Repolarization alternans: implications for the mechanism and prevention of sudden cardiac death. *Cardiovasc Res.* 2003;57:599–614.

[8] Gold MR, Spencer W. T wave alternans for ventricular arrhythmia risk Stratification. *Curr Opin Cardiol.* 2003;18:1–5.

[9] http://en.wikipedia.org/wiki/Voltage_clamp

[10] http://content.elearning-unicam.it/repository/fisiologia/unit_3/sco_7/text.html

[11] http://en.wikipedia.org/wiki/Electrophysiology#Current_clamp

[12] http://en.wikipedia.org/wiki/Patch_clamp

[13] Dorval, A.D., Christini, D.J., and White, J.A.(2001).Real-time LINUX dynamic clamp: a fast and flexible way to construct virtual ion channels in living cells. *Ann.Biomed.Eng.* 29, 897–907.

- [14] Prinz, A.A., Abbott, L.F., and Marder, E. (2004). The dynamic clamp comes of age. *Trends Neurosci.* 27, 218–224.
- [15] Raikov, I., Preyer, A., and Butera, R. J. (2004). MRCI: a flexible real-time dynamic clamp system for electrophysiology experiments. *J. Neurosci. Methods* 132, 109–123.
- [16] Bettencourt, J.C., Lillis, K.P., Stupin, L. R., and White, J.A. (2008). Effects of imperfect dynamic clamp: computational and experimental results. *J. Neurosci. Methods* 169, 282–289.
- [17] Berecki, G., Zegers, J.G., Bhuiyan, Z.A., Verkerk, A.O., Wilders, R., and Van Ginneken, A.C.G. (2006). Long-QT syndrome-related sodium channel mutations probed by the dynamic action potential clamp technique. *J. Physiol.* 570, 237–250.
- [18] Wilders, R. (2006). Dynamic clamp: a powerful tool in cardiac electrophysiology. *J. Physiol.* 576, 349–359
- [19] Kispersky, T.J., Economo, M.N., Randeria, P., and White, J.A. (2011). GenNet: a platform for hybrid network experiments. *Front. Neuroinform* 5:11. doi:10.3389/fninf.2011.00011
- [20] Lin, R.J., Bettencourt, J., White, J.A., Christini, D.J., and Butera, R.J. (2010). Real-time experiment interface for biological control applications. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 4160–4163.
- [21] Bertil Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer
- [22] A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 1952 Aug;117(4):500-44.
- [24] <http://fohs.bgu.ac.il/nia/NIA2003/neurolab/appendix/equat.hh/equivcrt.htm>
- Beeler GW and Reuter H (1977). Reconstruction of the Action Potential of Ventricular Myocardial Fibers. *J. Physiol.* 268: 177.
- [25] <http://models.cellml.org/e/1>
- [26] *Circ Res.* 1991 Jun;68(6):1501-26. A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction.
- [27] Mathematical model of an adult human atrial cell: the role of K⁺ currents in repolarization. Nygren A, Fiset C, Firek L, Clark JW, Lindblad DS, Clark RB, Giles WR. *Circ Res.* 1998 Jan 9-23;82(1):63-81.
- [28] Kherlopian, Armen R., Francis A. Ortega, and David J. Christini. "Cardiac myocyte model parameter sensitivity analysis and model transformation using a genetic algorithm." *Proceedings of the 13th annual conference companion on Genetic and evolutionary computation. ACM*, 2011.

- [29] Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C, Evanado A, Kehr E, Al Samara M, Mariani R, Gunson K, Jui J. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Prog Cardiovasc Dis*. 2008 Nov;51(3):213-28.
- [30] Zaniboni M, Pollard AE, Yang L, Spitzer KW. Beat-to-beat repolarization variability in ventricular myocytes and its suppression by electrical coupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Mar;278(3):H677-87.
- [31] Luo, Ching-hsing, and Yoram Rudy. "A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes." *Circulation research* 74.6 (1994): 1071-1096.
- [32] <http://digilander.libero.it/ferrucciodebellis/3.htm>
- [33] Pastore JM, Girouard SD, Laurita KR, Akar FG, Rosenbaum DS. Mechanism linking T-wave alternans to the genesis of cardiac fibrillation. *Circulation*. 1999 Mar;100(10):1385-94.
- [34] Sastry K. Single and Multiobjective Genetic Algorithm Toolbox in C++ IlliGAL Report No. 2007016. 2007 Jun; (<http://illigal.org/category/source-code/>)
- [35] <http://openmp.org/wp/>
- [36] Rapid genetic algorithm optimization of a mouse computational model: benefits for anthropomorphization of neonatal mouse cardiomyocytes. Bot CT, Kherlopian AR, Ortega FA, Christini DJ, Krogh-Madsen T. *Front Physiol*. 2012 Nov 5;3:421. doi: 10.3389/fphys.2012.00421. eCollection 2012.
- [37] Bryant SM, Wan X, Shipsey SJ, and Hart G. Regional differences in the delayed rectifier current (i_{kr} and i_{ks}) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc Res*. 1998 Nov; 40(2):322–31.
- [38] Syed Z, Vigmond E, Nattel S, Leon LJ. Atrial cell action potential parameter fitting using genetic algorithms. *Med Biol Eng Comput*. 2005 Sep;43(5):561-71.
- [39] Ahrens-Nicklas, R.C., and Christini, D.J. (2009). Anthropomorphizing the mouse cardiac action potential via a novel dynamic clamp method. *Biophys.J.* 97, 1–10.
- [40] Sastry, K. (2007). Single and Multiobjective Genetic Algorithm Toolbox in C++. IlliGAL Report, No. 2007016 [online]. Available at: <http://illigal.org/category/source-code/> [accessed October 15, 2012]
- [41] Grandy, S.A., Trépanier-Boulay, V., and Fiset, C. (2007). Post natal development has a marked effect on ventricular repolarization in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, 2168–2177.

[42] Vanier, M.C., and Bower, J.M. (1999). A comparative survey of automated parameter-search methods for compartmental neural models. *J. Comput.Neurosci.* 7, 149–171.