



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI**

**TECNICHE DI RIPARAMETRIZZAZIONE NELLA
PROGETTAZIONE OTTIMALE DI ESPERIMENTI PER
L'IDENTIFICAZIONE DI MODELLI**

Relatore: Prof. Fabrizio Bezzo
Correlatore: Dr. Federico Galvanin

Laureando: RICCARDO DE LUCA

ANNO ACCADEMICO 2011 – 2012

“Sii il cambiamento che vuoi vedere avvenire nel mondo”

Mahatma Gandhi

Riassunto

La progettazione di esperimenti basata su modello (MBoE) è uno strumento potente in grado di massimizzare il contenuto informativo derivato da prove sperimentali, dal momento che consente di individuare il miglior set di prove da effettuare al fine di identificare il set parametrico del modello in maniera precisa e accurata.

In questo lavoro di Tesi viene affrontata la problematica della progettazione ottimale di esperimenti basata su modello nel caso in cui quest'ultimo presenti problemi di identificabilità parametrica; in particolare è stato esaminato un modello farmacodinamico che descrive l'azione degli antibiotici sulla crescita batterica in esperimenti condotti *in vitro*.

Data l'alta correlazione presente tra i parametri del modello sopra citato e i conseguenti problemi di identificabilità dello stesso, si è testata la validità di un nuovo metodo che consenta di progettare gli esperimenti, basandosi su manipolazioni algebriche dei parametri e lasciando inalterata la struttura del modello stesso.

Sono stati simulati diversi casi evidenziando come questo nuovo approccio possa risultare uno strumento efficace per effettuare in qualsiasi caso la progettazione degli esperimenti, riuscendo anche a migliorare l'accuratezza della stima parametrica.

Indice

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1 – Modelli farmacocinetici e farmacodinamici	3
1.1 INTRODUZIONE AI MODELLI PK/PD	3
1.1.1 Modellazione farmacocinetica	4
1.1.2 Modellazione farmacodinamica	7
1.2 CURVE TIME-KILL: DESCRIZIONE GENERALE	8
CAPITOLO 2 – Tecniche di riparametrizzazione applicate alla progettazione ottimale di esperimenti basata sul modello	13
2.1 INTRODUZIONE ALLA PROGETTAZIONE OTTIMALE DI ESPERIMENTI.....	13
2.2 PROGETTAZIONE OTTIMALE DEGLI ESPERIMENTI	19
2.2.1 Quantificazione dell'informazione generata da un esperimento	20
2.2.2 Criteri di progettazione	22
2.2.3 Realizzazione di esperimenti in silico.....	24
2.2.4 Stima parametrica	24
2.3 PROGETTAZIONE OTTIMALE DEGLI ESPERIMENTI BASATA SU TECNICHE DI RIPARAMETRIZZAZIONE	26
2.3.1 Un esempio applicativo	29
CAPITOLO 3 – Applicazione di tecniche di riparametrizzazione applicate a un modello farmacologico	33
3.1 DESCRIZIONE DEL MODELLO	33
3.2 PROGETTAZIONE DELL' ESPERIMENTO BASATA SU TECNICHE DI RIPARAMETRIZZAZIONE	38
3.2.1 Stima parametrica basata su tre esperimenti in parallelo	40
3.2.1.1 Caso continuo	41
3.2.1.2 Caso discreto	44
3.2.2 Influenza dell'errore relativo alla stima parametrica iniziale sulla riparametrizzazione della progettazione	46
CAPITOLO 4 – Influenza dell'errore di misura sulla progettazione ottimale degli esperimenti	49
4.1 RELAZIONE TRA L'AUMENTO DELL'ERRORE DI MISURA E LA STIMA PARAMETRICA	49
4.1.1 Determinazione della varianza del set parametrico θ	51

4.2 RISULTATI OTTENUTI SIMULANDO SERIE DI ESPERIMENTI IN PARALLELO	53
4.2.1 Caso non riparametrizzato	53
4.2.2 Caso riparametrizzato (caso 0)	54
4.2.3 Casi riparametrizzati con riadattamento della matrice A	56
4.2.3.1 Caso 1	56
4.2.3.2 Caso 2	58
4.2.4 Conclusioni.....	61
CONCLUSIONI	63
NOMENCLATURA	65
APPENDICE 1 - Tecniche di riparametrizzazione effettuate su un singolo esperimento	69
A1.1 IMPLEMENTAZIONE DI UNA SIMULAZIONE STOCASTICA PER L'INDIVIDUAZIONE DELLA MATRICE DI RIPARAMETRIZZAZIONE	71
APPENDICE 2 - Riparametrizzazione basata su parametri ottenuti dal prodotto dei parametri del modello	77
APPENDICE 3 - Alcune stime parametriche ottenute a partire dal set riparametrizzato	81
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	83
RINGRAZIAMENTI	85

Introduzione

La conoscenza del comportamento di un generico sistema e dei rapporti causa-effetto che lo costituiscono può essere rappresentata in maniera compatta attraverso l'utilizzo di modelli matematici che descrivono le leggi fisiche che regolano i fenomeni da rappresentare ed eventuali informazioni ottenute da studi pregressi tramite opportune espressioni analitiche. Qualora non vi sia un effettivo mismatch tra realtà e modello è quindi possibile progettare delle prove sperimentali basate su quest'ultimo (MBDoE *model-based design of experiments*) in maniera da massimizzare l'informazione ottenuta, ottimizzando il processo di identificazione parametrica in termini di tempo e denaro.

Assumendo che il modello sia una rappresentazione perfetta del sistema, è opportuno condurre due verifiche: una verifica di identificabilità parametrica *a priori* e una verifica *a posteriori* di realizzabilità della stima (identificazione parametrica del modello). La verifica di identificabilità parametrica del modello richiede di provare che non esistano molteplici set parametrici che generano la stessa risposta da parte del modello. La verifica di realizzabilità della stima, invece, consiste nel determinare se è possibile, nella pratica, con misure affette da errore, ideare uno o più esperimenti che consentano la stima precisa dei parametri.

In questo lavoro di Tesi si affronta il problema di identificabilità parametrica relativa a un modello farmacodinamico (Tam *et al.* 2005) utilizzato per la descrizione delle cosiddette *time-kill curves*, le quali riproducono l'evoluzione temporale della crescita di un ceppo batterico sottoposto a uno o più antibiotici.

Si descrivono dapprima i risultati ottenuti dai test numerici di identificabilità locale *a priori* comunemente utilizzati nel caso di modelli non lineari; si procede, quindi, alla verifica *a posteriori* della realizzabilità della stima, la quale risulta difficoltosa a causa dell'introduzione dell'errore di misura e della struttura intrinseca del modello oggetto di studio.

Alla luce di queste osservazioni viene proposto un nuovo metodo di progettazione degli esperimenti basato sulla manipolazione algebrica dei parametri, mantenendo inalterata la struttura del modello. In questo modo risulta possibile progettare degli esperimenti superando il problema dell'identificabilità *a posteriori* e migliorando, seppur leggermente, l'accuratezza della stima parametrica.

Si suggerisce infine di approfondire la ricerca sulle potenzialità del metodo, in particolare con riferimento sia all'ideazione di una procedura ottimale di manipolazione parametrica in funzione delle caratteristiche intrinseche del modello e della correlazione tra i parametri sia alla possibilità di automatizzare la procedura proposta.

La Tesi è strutturata come segue.

Nel Capitolo 1 viene descritto in maniera generale il campo di applicazione della modellazione farmacocinetica e farmacodinamica, ponendo particolare attenzione ai modelli che descrivono l'andamento temporale di una popolazione batterica soggetta ad antibiotici, quali il modello di Tam *et al.* (2005a).

Il Capitolo 2 contiene la descrizione delle tecniche per l'identificazione del modello, i criteri per implementare la progettazione di esperimenti, i fondamenti teorici della progettazione di esperimenti MBD_{oE} e il metodo di stima basato sulla massima verosimiglianza. Al termine del Capitolo si presenta il metodo di riparametrizzazione proposto per cercare di risolvere il problema di identificabilità

Nel Capitolo 3 si presentano i test numerici per valutare l'identificabilità del modello studiato e varie progettazioni per la stima dei parametri del modello, confrontando i risultati ottenuti con la progettazione classica e quelli ottenuti applicando il nuovo metodo e valutando il potenziale miglioramento offerto dalla riparametrizzazione della progettazione.

Con il Capitolo 4 si introduce rumore sulle misure e si valuta l'efficacia del metodo realizzando diverse progettazioni di esperimenti secondo varie configurazioni del nuovo set parametrico su cui basare la progettazione.

Infine, una discussione sui risultati ottenuti e sulle prospettive di sviluppo future conclude il lavoro di Tesi.

Capitolo 1

Modelli farmacocinetici e farmacodinamici

La ricerca attuale in campo clinico, dallo sviluppo di nuovi farmaci all'adozione di terapie antitumorali ottimali, richiede una conoscenza sempre più precisa dei meccanismi che regolano i sistemi biologici da un punto di vista quantitativo; risulta pertanto necessario introdurre modelli matematici in grado di descrivere i fenomeni d'interesse nella maniera più generale possibile, evitando in questo modo l'incertezza legata alla conoscenza empirica, spesso fonte di errate generalizzazioni a partire da risultati ottenuti per casi particolari.

1.1 Introduzione ai modelli PK/PD

In campo clinico la conoscenza dell'effetto temporale di un farmaco sul paziente assume un'importanza cruciale, soprattutto nel caso in cui sia necessario restringere la finestra terapeutica in un intervallo limitato e, in particolar modo, per farmaci che manifestano un certo grado di tossicità sopra un determinato livello di concentrazione.

Tale conoscenza si può ottenere tramite una descrizione quantitativa della relazione temporale farmaco-microrganismo patogeno e, quindi, attraverso la selezione di un modello matematico che descriva in maniera precisa il sistema studiato.

Le prime descrizioni matematiche relative a processi biologici, utilizzate in campo clinico, sono ascrivibili alle branche della farmacologia denominate farmacocinetica e farmacodinamica; con farmacocinetica (*pharmacokinetics* - PK) si intende lo studio degli effetti dei processi che avvengono nell'organismo (assorbimento, trasporto, trasformazione, eliminazione) relativamente al generico composto chimico introdotto; la farmacodinamica (*pharmacodynamics* - PD) invece mira a descrivere a vari livelli gli effetti di un determinato farmaco sui processi fisiologici e biochimici di un particolare sistema biologico. Nonostante la distinzione tra le due branche generi spesso qualche ambiguità, esse differiscono sostanzialmente per quanto riguarda il possibile campo di applicazione: la farmacodinamica è studiata tramite esperimenti *in vitro*, la farmacocinetica è invece applicata a sistemi *in vivo*. Dal momento che gran parte dei modelli farmacologici esistenti allo stato attuale si basa sull'utilizzo di indici derivati dalla combinazione di parametri farmacocinetici e farmacodinamici (si parla per l'appunto di modelli PK/PD [Danhof *et al.*, 2008]), si passa a

una breve descrizione dei parametri generalmente utilizzati in ambito farmacologico prima di illustrare il modello studiato in questo lavoro di Tesi.

1.1.1 Modellazione farmacocinetica

La farmacocinetica è la disciplina scientifica che mira a quantificare i processi ai quali è soggetto un farmaco dal momento in cui è somministrato al paziente (assorbimento) fino alla sua effettiva eliminazione (escrezione), passando attraverso fasi intermedie di distribuzione e metabolizzazione.

La fase di assorbimento descrive il passaggio del farmaco dalla sede di somministrazione al circolo sistemico; questa fase dipende prevalentemente da fattori quali la facilità di diffusione del farmaco nel tessuto cellulare (funzione di proprietà intrinseche quali il grado di liposolubilità), dall'irrorazione della sede di somministrazione, dalla temperatura e da eventuali effetti vasocostrittori dovuti al tipo di farmaco utilizzato.

Tuttavia il fattore che influenza maggiormente l'assorbimento è la via di somministrazione, ossia la modalità selezionata per far penetrare il farmaco nell'organismo: la somministrazione può essere effettuata per via enterale (orale, sublinguale, buccale, rettale) o per via parenterale; in Letteratura si parla anche di somministrazione per vie sistemiche, nel caso in cui il farmaco agisca su targets distanti dalla sede di somministrazione, o per vie topiche, quando il farmaco agisce localmente nella sede di inserimento del farmaco; un'ultima classificazione è quella che divide le vie di somministrazione in naturali (quando l'assorbimento avviene attraverso il tessuto epiteliale o le mucose) e artificiali (quando si introduce il farmaco con mezzi quali aghi e siringhe).

La distribuzione è la seconda fase della farmacocinetica ed esprime il trasporto del farmaco verso i tessuti periferici; la velocità di distribuzione è influenzata dalle caratteristiche intrinseche del farmaco, dalla permeabilità dei capillari, dal flusso ematico presente nei vari organi, dal legame eventuale con le proteine plasmatiche che inibiscono il trasporto.

Nella fase di metabolizzazione gli enzimi presenti nei diversi tessuti, in particolare fegato, intestino, reni, polmoni, trasformano le molecole che non raggiungono il target in molecole maggiormente solubili e, di conseguenza, più facili da eliminare attraverso le urine.

L'eliminazione, infine, è l'ultima fase della farmacocinetica e si occupa di descrivere tutti i processi riguardanti l'escrezione del farmaco o di un suo metabolita dall'organismo: la via di eliminazione principale è quella renale, nel caso in cui la sostanza sia idrosolubile e possa quindi essere filtrata dai capillari glomerulari ed eliminata con le urine; altre vie di eliminazione sono quella epatica (per metaboliti non solubili), quella polmonare (per sostanze volatili) e quelle accessorie (saliva, sudore, ...).

La rappresentazione matematica e, conseguentemente, la conoscenza dei parametri caratteristici di ciascuna di queste fasi è fondamentale per poter prescrivere a un paziente

un'appropriata terapia, la cui efficacia è determinata dalla concentrazione di farmaco presente nel sito di azione o recettore. Bisogna precisare che spesso quest'ultima è difficilmente misurabile; pertanto, nella maggioranza dei casi, si prende in considerazione la concentrazione nel plasma supponendo che questa sia in equilibrio con la concentrazione effettiva presente nel recettore.

Per descrivere al meglio il sistema, la farmacocinetica utilizza il concetto di modelli compartimentali: in pratica l'intero organismo viene suddiviso in subunità interessate al flusso di farmaco e alla sua eliminazione. In Figura 1.1 si riporta un esempio di questo tipo di schematizzazione: in particolare si ha un modello a quattro compartimenti, in cui sono evidenti i flussi di materia presenti, ognuno dei quali è caratterizzato da una costante di velocità k_{ij} che indica la velocità di trasferimento/rimozione del farmaco dal compartimento i al compartimento j .

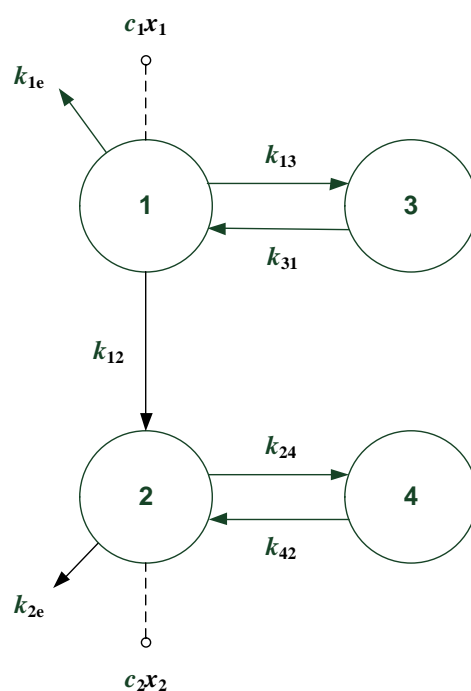


Figura 1.1 Esempio di schema compartimentale (Evans et al., 2001). Le frecce continue indicano i flussi di materia intercompartimentali; le frecce tratteggiate indicano i punti accessibili per le misurazioni.

Il modello a compartimenti più semplice è quello monocompartimentale, il quale si basa sull'assunzione che il farmaco raggiunga istantaneamente una distribuzione omogenea in tutto il corpo; questo tipo di modello si avvale dell'utilizzo di alcuni indici farmacocinetici frequentemente utilizzati nella pratica clinica, tra cui:

- *Volume di distribuzione (V_d [L])*: questa grandezza non ha un reale significato fisico; essa rappresenta il volume di plasma in cui sarebbe necessario solubilizzare la quantità totale di farmaco presente nell'organismo, in maniera da ottenere la concentrazione plasmatica effettivamente misurata; essa viene indicata con l'espressione:

$$V_d = \frac{X}{C_p} \quad (1.1)$$

dove X è la quantità di farmaco presente nell'organismo (che nel caso di un assorbimento del 100% corrisponde alla dose somministrata) e C_p è la concentrazione plasmatica del farmaco stesso;

- *Clearance* (CL [$L \cdot h^{-1}$]): rappresenta il volume di sostanza rimossa da un compartimento nell'unità di tempo ed è calcolabile come:

$$CL = k \cdot V_d \quad (1.2)$$

dove k è la costante cinetica di eliminazione e V_d è il volume di distribuzione;

- *Tempo di emivita* ($t_{1/2}$ [h]): è il tempo richiesto per ridurre la concentrazione di un farmaco a metà del valore iniziale; questo parametro è molto utile per stimare, ad esempio, quanto a lungo un farmaco debba essere sospeso nel caso in cui esso raggiunga valori tossici per il paziente;
- *Biodisponibilità* (F [-]): rappresenta l'efficienza con cui il farmaco raggiunge il target desiderato ed è data dal rapporto tra la quantità di farmaco che raggiunge l'obiettivo e la quantità di farmaco effettivamente dosata.

Si menziona inoltre un altro indice ampiamente utilizzato, l'*AUC* (*area under curve*); questa grandezza, espressa in $mg \cdot L^{-1} \cdot h$, corrisponde all'integrale temporale della concentrazione del farmaco in un determinato comparto a partire dal tempo di immissione fino a un tempo infinito. Questo indice, rapportato al valore di MIC (definito nel sottoparagrafo 1.1.2), costituisce al giorno d'oggi uno degli indici PK/PD maggiormente utilizzati in campo farmacologico per la valutazione dell'efficienza di un farmaco.

La conoscenza del valore degli indici farmacocinetici permette di affrontare il problema del dosaggio del farmaco con un approccio maggiormente razionale, evitando la correzione per tentativi del quantitativo ottimale da somministrare al paziente; oltre a questo gli studi *in vivo* danno utili indicazioni per la ricerca e sviluppo di nuovi farmaci, dal momento che un semplice studio *in vitro* non è in grado di evidenziare alcuni aspetti importanti quali la velocità di distribuzione del farmaco piuttosto che le proprietà di assorbimento della sostanza da parte dell'organismo, fattori che influenzano in maniera rilevante la reale efficacia dell'azione farmacologica.

1.1.2 Modellazione farmacodinamica

Se la modellazione farmacocinetica ha lo scopo di ottenere una relazione quantitativa tra la concentrazione di farmaco somministrata e quella effettivamente presente nel sito di infezione, lo scopo della farmacodinamica consiste nel comprendere i meccanismi che avvengono esclusivamente nel sito d'azione del farmaco.

L'effetto di un farmaco è legato all'interazione con composti macromolecolari degli organismi viventi, detti recettori: un farmaco è definito agonista qualora sia in grado di attivare il recettore e la risposta biochimica ad esso connessa; in caso contrario si utilizza il termine antagonista, in quanto l'interazione con il recettore porta al blocco dell'interazione con il generico ligando endogeno.

È utile ricordare che un farmaco può legarsi a un recettore sia in maniera reversibile o irreversibile; nel primo caso, si ha quello che è definito legame competitivo, in quanto il legame con il recettore, nel caso in cui si utilizzino più farmaci ad esso affini, avviene in maniera concorrenziale.

Tra i modelli farmacodinamici più utilizzati, vi è l'equazione di Hill (1910); essa non è altro che un'equazione logistica a tre parametri, che assume la seguente espressione:

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C^H}{C^H + EC_{50}^H} \quad (1.3)$$

dove:

- E è l'effetto farmacologico misurato;
- E_{\max} è il massimo effetto che si può ottenere;
- EC_{50} è la concentrazione di farmaco per la quale si ottiene metà dell'effetto massimo;
- H è l'esponente di sigmoidicità; nel caso in cui esso assuma valori interi, l'equazione (1.3) descrive uno schema di reazioni, detto di cooperazione positiva, e il modello assume un significato fisico; nel caso in cui l'esponente assuma valori frazionari la formula perde il significato fisico, ma non si altera la capacità rappresentativa dell'equazione.

La combinazione tra modellazione farmacodinamica e farmacocinetica e la conseguente individuazione di nuovi indici descrittivi, dà vita a modelli combinati (modelli PK/PD) in grado di descrivere in maniera precisa ogni singolo sistema. Questo aspetto è di importanza enorme in campo clinico, in quanto permette la descrizione del comportamento dell'organismo di un singolo paziente a fronte della somministrazione di una determinata dose di farmaco; una determinazione accurata e precisa dei parametri costitutivi di un modello porta alla definizione di una finestra terapeutica ottimale (in termini di compromesso tra efficacia del trattamento e danno prodotto al paziente a causa della tossicità del farmaco) per il singolo individuo. La determinazione dei parametri per il singolo individuo risulta

essenziale nel caso in cui questi si discostino notevolmente dai valori medi ottenuti per la popolazione: nella pratica clinica, infatti, si utilizzano ampiamente dei modelli di popolazione per sviluppare in termini statistici i parametri che garantiscono l'effetto terapeutico migliore per la maggior parte dei campioni che la costituiscono: questo approccio è di norma utilizzato per lo sviluppo di nuovi farmaci prima della commercializzazione su larga scala.

La modellazione applicata al singolo individuo permette invece di stimare con precisione dei parametri ad hoc da applicare al singolo paziente, garantendo flessibilità di trattamento e adattamento della terapia al paziente, aspetto fondamentale in particolare per la cura di malattie tumorali.

In entrambi i casi è comunque fondamentale la progettazione degli esperimenti necessari per ottenere la stima parametrica desiderata; per fare questo è necessario definire le variabili controllate e manipolate del sistema e fissare i tempi di campionamento che garantiscono la massima informazione possibile.

L'obiettivo di questo lavoro di Tesi consiste nell'introduzione di un nuovo metodo di progettazione degli esperimenti al fine di identificare i parametri di un modello farmacologico relativo a un singolo sistema; in particolare, si studierà il modello di Tam *et al.* (2005), che descrive in maniera quantitativa il fenomeno della resistenza batterica agli antibiotici simulando il profilo delle curve time-kill, definite nel paragrafo seguente.

1.2 Curve time-kill: descrizione generale

Nel paragrafo precedente si è visto come la combinazione tra farmacodinamica e farmacocinetica permetta di legare la concentrazione del farmaco dosata agli effetti antimicrobici e agli eventuali effetti tossici che possono essere causati da un errato dosaggio (Levison, 2004).

I principali composti impiegati nelle terapie antimicrobiche sono gli antibiotici, in quanto farmaci in grado di compiere un'azione selettiva sui batteri senza provocare effetti negativi sulle cellule dell'organismo infetto; gli studi di batteriocidia (o time-kill) sono pertanto tipicamente utilizzati nella fase pre-clinica di ricerca di nuovi agenti antibiotici da introdurre sul mercato per la loro facilità e per il basso impatto economico richiesto dalla sperimentazione.

In generale gli antibiotici si possono classificare in due gruppi: gli antibiotici batteriostatici, il cui effetto principale consiste nell'inibizione della crescita del ceppo batterico, e gli antibiotici battericidi, il cui effetto è la morte del batterio infettante; il loro corretto utilizzo si basa pertanto sulla comprensione dell'azione da essi esercitata sulle cinetiche di crescita e morte batterica.

La capacità di descrivere l'evoluzione di una popolazione batterica diventa quindi un elemento imprescindibile per la modellazione dell'azione dell'antibiotico; è noto che la riproduzione batterica avvenga per scissione binaria e che la crescita dei batteri nei terreni di coltura segua un andamento che avviene su scale temporali diverse a seconda del tipo di batterio, ma che presenta una dinamica comune a tutte le specie conosciute.

Inizialmente si ha una fase di adattamento del ceppo batterico all'ambiente (terreno di coltura), vi è poi una fase di crescita esponenziale fino all'esaurimento del substrato fornito dal terreno di coltura, una fase di stabilità e infine una fase di diminuzione della popolazione fino all'estinzione.

Questa analogia interspecie permette una modellazione generale di tale comportamento, in genere descritto attraverso un termine di crescita e uno di decadimento, utilizzando equazioni logistiche/equazione di Hill; nel momento in cui si altera la naturale cinetica batterica tramite l'introduzione di un antibiotico nell'organismo, si induce un cambiamento sul valore dei parametri che descrivono il fenomeno.

La conoscenza delle caratteristiche farmacodinamiche di un antibiotico, quali la capacità di inibizione della crescita batterica, la velocità e la durata dell'azione battericida e l'eventuale effetto post-antibiotico (PAE), permette di progettare con maggior sicurezza una terapia ottimale in termini di quantità di farmaco e intervallo temporale di somministrazione.

L'attività antibatterica di un farmaco è solitamente definita attraverso la determinazione di indici quali la minima concentrazione inibitoria (MIC) e la minima concentrazione battericida (MBC), entrambe determinate in vitro dopo una notte di incubazione in una ambiente senza proteine a pH pari a 7.2.

In particolare la MIC è definita come la minima concentrazione di antibiotico necessaria a evitare che una sospensione di 10^5 cfu/mL diventi torbida dopo una notte di incubazione: la torbidità è infatti conseguenza di un aumento della densità batterica pari a circa 10 volte la condizione iniziale fissata come standard.

Nel caso in cui la concentrazione minima di antibiotico in grado di evitare la formazione di una sospensione torbida riesca anche a causare una diminuzione della densità batterica da 10^5 cfu/mL a 10^2 cfu/mL, questa viene definita MBC.

In genere un farmaco battericida ha un valore di MBC simile o di poco superiore rispetto a quello di MIC; per un farmaco batteriostatico, invece, quest'ultima risulta notevolmente inferiore rispetto al MBC.

L'utilizzo di questi indici è essenziale per la comprensione degli effetti di un farmaco su un determinato ceppo batterico, ma presenta diversi limiti:

- I valori sono ottenuti da esperimenti in vivo: generalmente in questo caso l'inoculo batterico si trova nella fase di crescita esponenziale, a differenza del caso in vivo in cui tipicamente i microrganismi si trovano nella fase di stabilità post-infezione;

- I valori sono ottenuti a concentrazioni standard di inoculo batterico, spesso diverse da quelle presenti nel sito di infezione;
- I valori sono determinati a un istante temporale fissato e non forniscono alcun tipo di informazione sulle variazioni temporali dell'effetto del farmaco sul microrganismo.

L'incompletezza della conoscenza sul sistema farmaco-microrganismo causata dai suddetti problemi rende necessaria l'ideazione di modelli dinamici in grado di descrivere in maniera puntuale il comportamento antibatterico.

L'uso di modelli più complessi nasce anche dalla necessità di riuscire a ricostruire il fenomeno detto di ricrescita batterica, altrimenti non rappresentabile; può accadere infatti che una popolazione batterica precedentemente sensibile all'antibiotico diventi resistente durante la cura o che la terapia non permetta di eliminare completamente l'infezione causando una ripresa dell'infezione dopo il periodo di cura. Il problema della farmaco-resistenza è una delle principali sfide della sanità mondiale in quanto restringe la disponibilità di farmaci per le cure antibiotiche; le cause del fenomeno possono essere dovute sia a mutazioni genetiche della popolazione sottoposta alla pressione antibiotica, sia a una resistenza, detta fenotipica, attribuibile a dinamiche caratteristiche del ceppo batterico.

I test di laboratorio finalizzati all'individuazione di terapie antibatteriche hanno assunto negli ultimi anni un'importanza sempre maggiore a causa del continuo aumento di pazienti infetti da microrganismi farmaco-resistenti. L'attuazione di studi in vitro risulta molto complessa e fornisce solo una descrizione limitata in merito alla farmacodinamica del farmaco oggetto di studio. La relazione tra attività battericida e la concentrazione di farmaco di solito non è caratterizzata in maniera quantitativa, rendendo difficoltoso il passaggio dall'informazione ottenuta da esperimenti in vitro verso la formulazione di una terapia razionale.

Per lo studio completo dell'evoluzione batterica a seguito di somministrazione di antibiotico è quindi preferibile fare ricorso a modelli dinamici che possano rappresentare anche quest'ultimo aspetto: negli studi di batteriocidia infatti viene riportato unicamente il valore finale della concentrazione osservato durante le prove sperimentali.

In passato per descrivere il fenomeno si utilizzavano tecniche di modellazione che assumevano che la popolazione batterica fosse costituita da due subpopolazioni con differente sensibilità al farmaco. Il fenomeno di ricrescita veniva pertanto attribuito al fatto che inizialmente il farmaco agisse sulla subpopolazione maggiormente sensibile alla sua azione, permettendo l'aumento selettivo della subpopolazione resistente; questo approccio, tuttavia, solitamente non risulta informativo fino al momento in cui l'intera popolazione batterica è dominata dalla subpopolazione resistente; dato il fatto che i tipici studi di time-kill sono attuati in 24 h, può accadere che non ci sia tempo sufficiente affinché la subpopolazione resistente diventi prevalente nel breve periodo di studio.

Di conseguenza è sorto il problema di individuare dei modelli in grado di rappresentare in maniera maggiormente flessibile il fenomeno di batteriocidia; il modello che verrà preso in considerazione in questa Tesi è quello proposto da Tam *et al.* (2005).

Si rimanda la descrizione del modello e dei parametri che lo caratterizzano al capitolo 3: in questa sede si vuole anticipare che l'oggetto dello studio è la descrizione del profilo dinamico di concentrazione di un ceppo batterico di *Pseudomonas aeruginosa*, importante patogeno resistente a differenti antibiotici e causa di gravi malattie quali polmonite e sepsi; per questo, il trattamento ottimale di infezioni causate da questo batterio rappresenta una sfida per i medici, da risolvere nel minor tempo possibile per sintetizzare nuovi antibiotici più efficaci e/o per individuare strategie terapeutiche migliori.

Il modello proposto ha inoltre il vantaggio di non essere utilizzabile unicamente per una specifica combinazione farmaco-microorganismo, ma di risultare flessibile ed estrapolabile sia per altri agenti antimicrobici, sia per altre specie di patogeno con differenti caratteristiche biologiche.

La determinazione dei parametri specifici risulta pertanto un obiettivo fondamentale per poter descrivere con la massima accuratezza possibile la curva di time-kill e il fenomeno della ricrescita batterica e per consentire una conoscenza del sistema che permetta l'individuazione di una terapia ad hoc per ogni caso.

La rappresentazione del sistema studiato necessita la produzione di dati sperimentali per proporre e convalidare un modello adeguato e identificabile; tuttavia, effettuare esperimenti per stimare i parametri caratteristici di un modello senza un'adeguata progettazione può risultare dispendioso dal punto di vista temporale ed economico, nonché fuorviante a causa degli errori che caratterizzano ogni attività sperimentale.

Esistono delle tecniche di progettazione degli esperimenti che permettono di minimizzare le risorse necessarie per acquisire la massima conoscenza possibile sul sistema oggetto di studio e per ottenere quindi l'identificazione dei parametri caratteristici del modello descrittivo utilizzato; spesso questo problema è di difficile risoluzione a causa della struttura del modello, dell'errore dovuto agli strumenti utilizzati per le misurazioni, della tipologia di esperimenti applicabili.

Nel prossimo capitolo, prima di applicare le tecniche di progettazione degli esperimenti al modello biologico di Tam *et al.* (2005), evidenziando le problematiche di identificabilità emerse, si passa alla descrizione delle procedure di progettazione degli esperimenti e all'introduzione di un nuovo metodo finalizzato al miglioramento della progettazione degli esperimenti nel caso in cui si presenti alta correlazione parametrica.

Capitolo 2

Tecniche di riparametrizzazione applicate alla progettazione ottimale di esperimenti basata sul modello

In questo capitolo viene illustrata la procedura classica utilizzata per la progettazione di esperimenti basata sul modello, nonché i fondamenti teorici su cui si basano le varie fasi di cui è costituita. In seguito si propone un nuovo metodo di progettazione al fine di attuare una progettazione ottimale dell'esperimento per una stima dei parametri accurata, nel caso in cui essi presentino un elevato grado di correlazione che pregiudica l'identificabilità del modello.

2.1 Introduzione alla progettazione degli esperimenti

L'adozione di tecniche di pianificazione sperimentale si basa sull'evidenza che l'acquisizione di dati sperimentali senza alcun criterio razionale conduce inequivocabilmente allo spreco di denaro, di tempo e di risorse umane; alla luce di questa considerazione nasce il DoE, *design of experiments*, che introduce il concetto di progettazione degli esperimenti.

La teoria alla base di questo approccio è stata proposta per la prima volta dal matematico Ronald A. Fisher nel libro *The design of experiments* del 1935, dove viene introdotto il metodo della progettazione fattoriale: l'obiettivo consiste nell'analizzare l'effetto della variazione di ogni fattore (i.e. variabile di progetto) sulla risposta del sistema in maniera da individuare una relazione input-output attraverso un'analisi di varianza.

Si noti come con un DoE le attività di modellazione e di sperimentazione si completino a vicenda attraverso una continua e biunivoca integrazione, come illustrato in Figura 2.1.

I dati sperimentali, infatti, generano l'informazione per definire i possibili modelli che descrivono il sistema, per selezionare e validare il modello ottimale e per eseguire l'identificazione parametrica del modello stesso. Se la rappresentazione del sistema effettuata tramite il modello è attendibile, quest'ultimo può essere a sua volta utilizzato per progettare nuovi esperimenti più informativi, dando vita a un loop potenzialmente infinito.

Le tecniche DoE hanno però lo svantaggio che, dal momento che si basano su modelli di regressione, necessitano di un numero elevato di dati per ottenere la definizione di un possibile modello, soprattutto quando i fattori sono numerosi; pertanto esse vengono applicate

generalmente nel caso in cui l'informazione preliminare sul sistema sia nulla, per ottenere una prima semplice descrizione delle relazioni input-output.

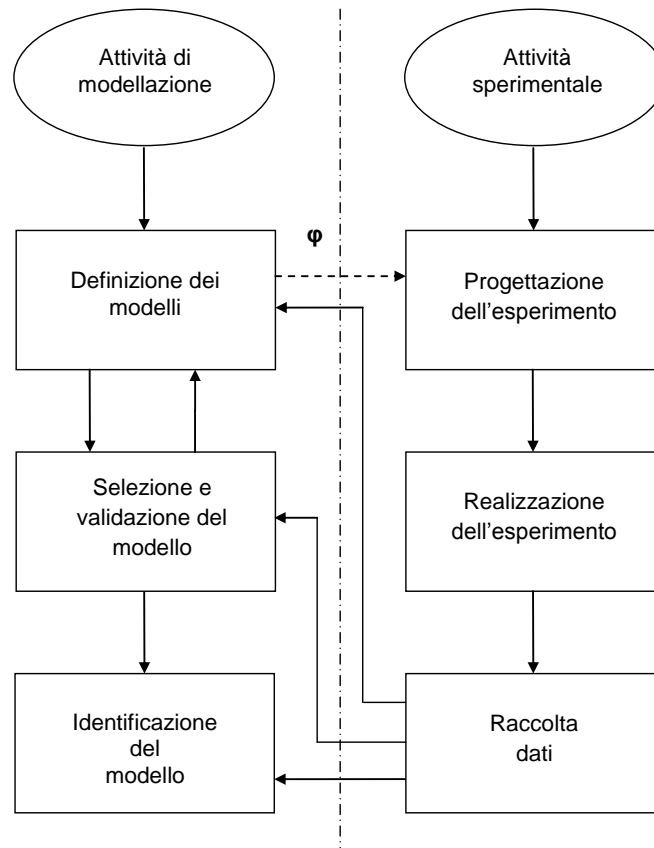


Figura 2.1 Relazione tra attività di modellazione e di sperimentazione; con la freccia tratteggiata è indicato il ponte di collegamento tra le due aree nel caso in cui (MBD_{oE}) il vettore dell'esperimento φ sia ricavato a partire dal modello (Galvanin, 2010)

Tuttavia, dal momento che nei sistemi fisici esiste una conoscenza preliminare dovuta al fatto che i fenomeni vengono descritti tramite opportuni modelli matematici che coinvolgono set di variabili e parametri, si può pensare che la descrizione del sistema fornita dal modello stesso contenga in maniera intrinseca delle informazioni sul sistema.

Su questa assunzione si basa il MBDoE (*Model-Based Design of Experiments*), ossia la progettazione ottimale dell'esperimento basata sul modello; questa tecnica non risente della necessità di un elevato numero di dati tipica del DoE per il fatto che si sfrutta fin dall'inizio l'informazione connessa al modello.

Il MBDoE è un approccio indicato in particolare nel caso in cui si studino fenomeni dinamici, descritti da equazioni algebrico-differenziali (DAE, *differential algebraic equations*); in generale il modello $\mathbf{M}(\boldsymbol{\theta})$ può essere descritto attraverso il sistema:

$$M(\boldsymbol{\theta}): \begin{cases} f(\dot{\mathbf{x}}(t), \mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t), \mathbf{w}, \boldsymbol{\theta}, t) = 0 \\ \hat{\mathbf{y}}(t) = g(\mathbf{x}(t)) \end{cases} \quad (2.1)$$

dove:

- $\mathbf{x}(t) \in \mathfrak{R}^{N_s}$ è il set di variabili di stato del sistema e $\dot{\mathbf{x}}(t) \in \mathfrak{R}^{N_s}$ è il vettore delle derivate temporali delle variabili di stato;
- $\mathbf{u}(t) \in \mathfrak{R}^{N_u}$ è il set di variabili manipolabili dipendenti dal tempo di dimensione N_u , ossia il vettore contenente gli ingressi del sistema che possono essere manipolati nel corso dell'esperimento (in genere si utilizzano input costanti a tratti o lineari a tratti);
- $\mathbf{w} \in \mathfrak{R}^{N_w}$ è il set di variabili manipolabili indipendenti dal tempo di dimensione N_w , ossia il vettore contenente gli ingressi del sistema che rimangono costanti durante l'esecuzione;
- $\boldsymbol{\theta} \in \mathfrak{R}^{N_\theta}$ è il set di parametri del modello contenente N_θ elementi;
- $\hat{\mathbf{y}}(t) \in \mathfrak{R}^{N_M}$ è il vettore di dimensioni N_M che contiene le risposte stimate dal modello;
- t è il tempo dell'esperimento ed assume tutti i valori compresi tra 0 (inizio dell'esperimento) e τ (fine dell'esperimento).

Oltre a questo è necessario definire il vettore $\boldsymbol{\phi}$, all'interno del quale sono inserite tutte le possibili variabili di controllo che possono essere utilizzate durante l'esperimento; tali variabili possono essere modificate sia all'inizio, sia durante il corso della prova sperimentale: variando opportunamente il loro valore/profilo temporale si mira a ottenere l'ottimizzazione della progettazione.

In particolare si può assumere che il vettore $\boldsymbol{\phi}$ sia dato da:

$$\boldsymbol{\phi} = \boldsymbol{\phi}(\mathbf{u}(t), \mathbf{w}, \mathbf{y}_0, \mathbf{t}_{sp}, \tau) \quad (2.2)$$

dove:

- \mathbf{t}_{sp} è il vettore di dimensione N_{sp} dei tempi di campionamento;
- τ rappresenta la durata dell'esperimento;
- \mathbf{y}_0 rappresenta il set di condizioni iniziali sulle variabili misurate.

La progettazione MBDoE viene applicata con l'obiettivo principale di ottenere l'identificazione parametrica del modello attraverso la stima accurata del set parametrico che lo costituisce.

Prima di procedere con la fase di progettazione vera e propria è tuttavia necessario che venga preventivamente studiata l'identificabilità del modello; in altre parole è necessario verificare la possibilità di ottenere l'identificazione parametrica prima di eseguire l'esperimento.

I test di identificabilità possono essere classificati in due categorie: test di identificabilità strutturale e test di identificabilità locale.

I test analitici di identificabilità strutturale (detta anche identificabilità "a priori") hanno lo scopo di dimostrare la possibilità di stimare i parametri come proprietà del modello, indipendentemente dai dati misurati e dall'incertezza connessa alla misurazione; l'identificabilità strutturale di un modello può essere (Cobelli, 2007):

- globale (univoca), se vale la relazione biunivoca: $\mathbf{M}(\boldsymbol{\theta}) = \mathbf{M}(\boldsymbol{\theta}^*) \Leftrightarrow \boldsymbol{\theta} = \boldsymbol{\theta}^*$: se questa è verificata tutti i parametri del modello risultano univocamente identificabili;
- locale (non univoca), se $\mathbf{M}(\boldsymbol{\theta}) = \mathbf{M}(\boldsymbol{\theta}^*)$ per un numero limitato di vettori $\boldsymbol{\theta}^*$: in questo caso tutti i parametri sono identificabili con l'eccezione di uno o più parametri che risultano non univocamente identificabili (ma per i quali si ha un numero di soluzioni finito);
- non esistente, se $\exists \theta_i$ tale per cui $\mathbf{M}(\boldsymbol{\theta}) = \mathbf{M}(\boldsymbol{\theta}^*) \forall \theta_i$, o, in altre parole, se esiste almeno un parametro non identificabile.

I test di identificabilità locale sono invece test numerici, anch'essi condotti a priori, ma effettuati in un intorno limitato del set parametrico $\boldsymbol{\theta}$; questi test mirano a valutare l'esistenza di altri set parametrici nell'intorno fissato in grado di produrre, per un determinato vettore $\boldsymbol{\varphi}$, la stessa uscita del modello generata dal set $\boldsymbol{\theta}$: sono uno strumento potente soprattutto nel caso in cui si studino modelli non lineari, difficilmente indagabili con metodi analitici.

Questi tipi di controllo coincidono con la valutazione della capacità di stimare univocamente un set parametrico, in assenza di errori sperimentali, con un numero sufficiente di punti di campionamento e circoscrivendo l'analisi a un intorno dei parametri considerati.

Un test locale che si può effettuare per verificare l'identificabilità locale è la determinazione del rango della matrice di stimabilità \mathbf{P}_E :

$$\mathbf{P}_E = \begin{bmatrix} \mathbf{S}_y(t_0) \\ \vdots \\ \mathbf{S}_y(t_{N_{sp}}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \left. \frac{\partial y_1}{\partial \theta_1} \right|_{t_0} & \dots & \left. \frac{\partial y_1}{\partial \theta_{N_\theta}} \right|_{t_0} \\ \dots & \ddots & \dots \\ \left. \frac{\partial y_{N_M}}{\partial \theta_1} \right|_{t_0} & \dots & \left. \frac{\partial y_{N_M}}{\partial \theta_{N_\theta}} \right|_{t_0} \\ \vdots & & \vdots \\ \left. \frac{\partial y_1}{\partial \theta_1} \right|_{t_{N_{sp}}} & \dots & \left. \frac{\partial y_1}{\partial \theta_{N_\theta}} \right|_{t_{N_{sp}}} \\ \dots & \ddots & \dots \\ \left. \frac{\partial y_{N_M}}{\partial \theta_1} \right|_{t_{N_{sp}}} & \dots & \left. \frac{\partial y_{N_M}}{\partial \theta_{N_\theta}} \right|_{t_{N_{sp}}} \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

dove:

$$\mathbf{S}_y(t_k) = \begin{bmatrix} \left. \frac{\partial y_1}{\partial \theta_1} \right|_{t_k} & \dots & \left. \frac{\partial y_1}{\partial \theta_{N_\theta}} \right|_{t_k} \\ \dots & \ddots & \dots \\ \left. \frac{\partial y_{N_M}}{\partial \theta_1} \right|_{t_k} & \dots & \left. \frac{\partial y_{N_M}}{\partial \theta_{N_\theta}} \right|_{t_k} \end{bmatrix} \quad (2.4)$$

è la matrice che raccoglie le sensitività di tutte le uscite a un determinato istante t_k .

Un metodo alternativo è il calcolo della correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E (Shaw, 1999); si è scelto di utilizzare quest'ultimo metodo in quanto in grado di fornire anche una prima indicazione quantitativa in merito alla difficoltà effettiva di stimare i parametri del modello.

La correlazione tra la generica colonna i -esima e la colonna j -esima di \mathbf{P}_E è data dalla formula:

$$c_{ij} = \frac{v_{ij}}{\sqrt{v_{ii} \cdot v_{jj}}}, \text{ con } v_{ij} = E\left[(p_{E_i} - \mu_i)(p_{E_j} - \mu_j)\right] \quad (2.5)$$

dove:

- p_{E_i} è un elemento dell' i -esima colonna di \mathbf{P}_E ;
- μ_i è il valor medio degli elementi dell' i -esima colonna di \mathbf{P}_E ;
- E indica il valore atteso.

I parametri localmente identificabili hanno correlazione compresa tra -1 e 1; nel caso in cui questi non siano localmente identificabili i termini di correlazione assumono valori pari a -1 o 1. È comunque possibile che, se le correlazioni assumono valori elevati (superiori in valore assoluto a 0.99), il sistema diventi non identificabile localmente a causa del numero limitato di campionamenti o dell'errore presente sui dati.

Quando il risultato del test di identificabilità è positivo si passa alla progettazione basata sul modello, schematizzata in Figura 2.2.

È giusto premettere che, anche qualora il test di identificabilità venga superato, non è garantito che si riesca a stimare i parametri; questo può avvenire a causa del fatto che, partendo da parametri di progetto non accurati, l'ottimizzazione porti all'assegnazione di valori delle variabili di progetto non adatti a stimolare il sistema nella maniera adeguata per ridurre l'incertezza parametrica.

Come si può osservare in Figura 2.2 l'approccio standard al MBDoE è quello sequenziale: in altre parole, a partire dalla conoscenza pregressa a disposizione (stime iniziali dei parametri e modello utilizzato), si passa alla progettazione dell'esperimento, alla sua realizzazione e infine si conclude con la stima parametrica.

A questo punto l'algoritmo prevede l'iterazione della procedura fino al raggiungimento di una stima accurata.

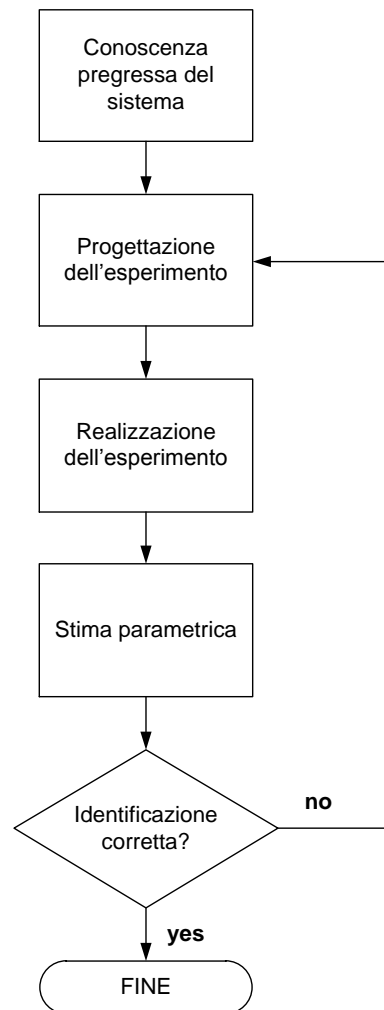


Figura 2.2 Schema di realizzazione degli esperimenti: progettazione sequenziale

In alternativa a questo approccio vi è quello in parallelo (Galvanin *et al.*, 2007), che prevede la progettazione e la conseguente realizzazione/simulazione di più esperimenti in parallelo (Figura 2.3a) e l'approccio sequenziale-parallelo (Figura 2.3b), combinazione delle due alternative precedenti.

Non esistono criteri univoci per selezionare il miglior approccio da adottare: generalmente la scelta è dettata da questioni di carattere economico, dal tempo a disposizione e dall'accuratezza desiderata: si evidenzia tuttavia che la strategia di progettazione in parallelo è applicabile a settori, come la microbiologia, in cui risulta praticamente possibile l'esecuzione di più esperimenti in contemporanea grazie all'utilizzo di strumenti quali gli arrays di microreattori.

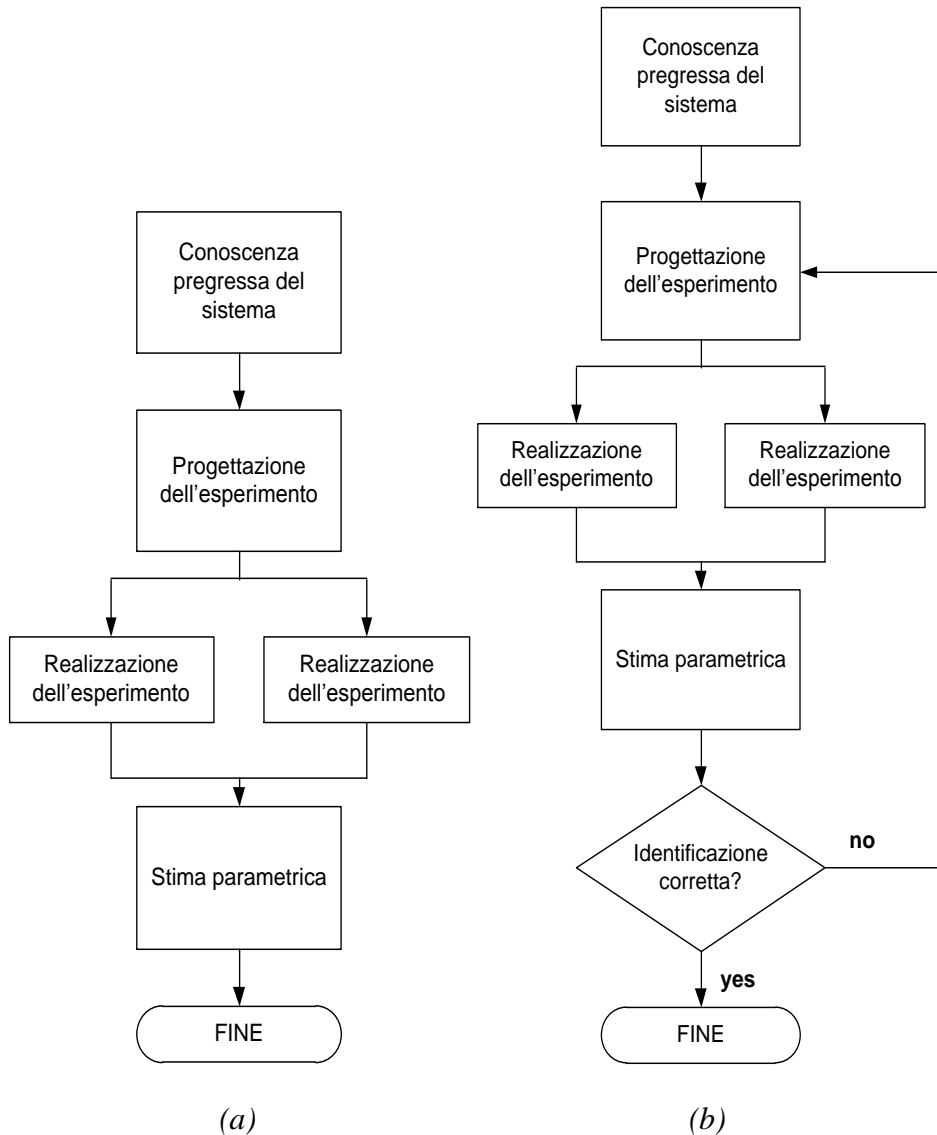


Figura 2.3 Schemi di realizzazione degli esperimenti: (a) progettazione in parallelo, (b) progettazione parallelo-sequenziale.

2.2 Progettazione ottimale degli esperimenti basata sul modello

Nella pratica comune non esistono, se non in casi limitati, procedure univoche per la conduzione di esperimenti al fine di identificare i parametri del modello che descrive il sistema oggetto di studio; risulta pertanto necessaria l'adozione di procedure generali che garantiscano la progettazione ottimale dell'esperimento.

È opportuno premettere che non esiste un'unica progettazione ottimale; quest'ultima infatti dipende dall'obiettivo finale dell'esperimento: a seconda che si voglia ottenere la minimizzazione dell'errore sulla stima parametrica, piuttosto che il superamento del mismatch tra modello e sistema reale, il vettore dell'esperimento ϕ potrà assumere valori differenti.

In generale l'ottimizzazione del vettore $\boldsymbol{\varphi}$ è ottenuta attraverso un compromesso tra massimizzazione della precisione e dell'accuratezza della stima parametrica e minimizzazione delle risorse utilizzate per condurre le prove sperimentali (tempo, personale, denaro).

La verifica finale dell'efficacia di una progettazione viene effettuata tramite la valutazione di:

- fitting tra dati sperimentali e dati predetti dal modello;
- accuratezza della stima parametrica;
- precisione della stima parametrica.

La progettazione sperimentale basata sul modello richiede la conoscenza dei seguenti elementi preliminari:

- stima parametrica iniziale $\boldsymbol{\theta}_0$ e informazioni sull'incertezza parametrica iniziale;
- scelta preliminare di un opportuno criterio di progettazione;
- definizione delle variabili misurate y e dell'errore sulle misure sperimentali;
- definizione del generico vettore dell'esperimento $\boldsymbol{\varphi}$ in modo da stabilire il campo di variabilità su cui poter effettuare la progettazione.

Nei paragrafi seguenti verranno spiegati in maniera dettagliata i fondamenti teorici che stanno alla base di ogni fase della progettazione.

2.2.1 Quantificazione dell'informazione generata da un esperimento

La progettazione ottimale di un esperimento consiste nel modificare il vettore dell'esperimento $\boldsymbol{\varphi}$ in maniera da ottimizzare una specifica funzione obiettivo; generalmente questa è costituita da una metrica della matrice di informazione di Fisher \mathbf{H}_θ definita come (Zullo, 1991):

$$\mathbf{H}_\theta(\boldsymbol{\theta}, \boldsymbol{\varphi}) = \sum_{r=1}^{N_M} \sum_{s=1}^{N_M} \tilde{\sigma}_{rs} \mathbf{Q}_r^T \mathbf{Q}_s \quad (2.6)$$

dove:

- $\tilde{\sigma}_{rs}$ è la componente r,s -esima dell'inversa della matrice $\boldsymbol{\Sigma}_y$ di varianza-covarianza sulle misure sperimentali;
- \mathbf{Q}_r è la matrice di sensitività dinamica relativa alla risposta r -esima il cui k,j -esimo elemento può essere scritto come:

$$q_{r,kj} = \left. \frac{\partial y_r}{\partial \theta_j} \right|_{t_k} \quad \text{con } r = 1, \dots, N_M; \quad j = 1, \dots, N_\theta; \quad k = 1, \dots, N_{sp}; \quad (2.7)$$

Bisogna precisare che la generica matrice $\boldsymbol{\Sigma}_y$ di varianza-covarianza sulle misure sperimentali assume la struttura riportata nella formula seguente.

$$\Sigma_{\mathbf{y}} = \begin{bmatrix} \sigma_{y_1}^2 & \sigma_{y_1, y_2}^2 & \cdots & \sigma_{y_1, y_{N_M}}^2 \\ \sigma_{y_2, y_1}^2 & \sigma_{y_2, y_2}^2 & \cdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \sigma_{y_{N_M}, y_1}^2 & \cdots & \cdots & \sigma_{y_{N_M}, y_{N_M}}^2 \end{bmatrix} \quad (2.8)$$

Nella trattazione successiva si impone che gli elementi extradiagonali siano nulli; questo equivale ad assumere che, all'interno dello stesso esperimento, le misure siano completamente indipendenti.

E' bene evidenziare che la matrice \mathbf{Q}_r definita in (2.7) e la matrice \mathbf{S}_y definita in (2.4) sono entrambe costituite da termini di sensitività: tuttavia la prima racchiude i valori di sensitività relativi alla risposta r -esima rispetto a ogni parametro, calcolati per ognuno degli N_{sp} punti di campionamento; la seconda invece è costituita dai valori di sensitività di ogni risposta rispetto a ciascun parametro a un dato istante temporale.

Nel caso in cui si abbia una sola risposta si ha il caso particolare per cui le N_{sp} righe della matrice \mathbf{Q}_r coincidono con le N_{sp} matrici \mathbf{S}_y calcolate agli N_{sp} istanti di tempo definiti da \mathbf{t}_{sp} . Nel momento in cui si effettuano N_{exp} esperimenti in sequenza, l'informazione può essere espressa come:

$$\mathbf{H}_\theta(\boldsymbol{\theta}, \boldsymbol{\varphi}) = \sum_{j=1}^{N_{exp}} \sum_{r=1}^{N_M} \sum_{s=1}^{N_M} \tilde{\sigma}_{rs,j} \mathbf{Q}_{r,j}^T \mathbf{Q}_{s,j} + \mathbf{H}_\theta^0 \quad (2.9)$$

dove \mathbf{H}_θ^0 rappresenta la matrice di informazione iniziale, spesso trascurabile in quanto all'inizio del MBDoe l'incertezza parametrica è alta.

Se gli N_{exp} esperimenti vengono invece condotti in parallelo, l'informazione può essere espressa come:

$$\mathbf{H}_\theta(\boldsymbol{\theta}, \boldsymbol{\varphi}) = \sum_{i=1}^{N_{exp}} \mathbf{H}_{\theta,i}^*(\boldsymbol{\theta}, \boldsymbol{\varphi}_i) \quad (2.10)$$

dove $\mathbf{H}_{\theta,i}^*$ rappresenta la matrice di informazione dell' i -esimo esperimento e $\boldsymbol{\varphi}_i$ è il vettore dell' i -esimo esperimento.

Il problema di massimizzazione di una metrica di \mathbf{H}_θ è spesso riformulato in termini di minimizzazione della metrica della matrice di varianza-covarianza dei parametri, ottenuta tramite la relazione:

$$\mathbf{V}(\boldsymbol{\theta}, \boldsymbol{\varphi}) = [\mathbf{H}_\theta(\boldsymbol{\theta}, \boldsymbol{\varphi})]^{-1} \quad (2.11)$$

da cui è possibile ricavare la matrice approssimata Σ_θ di varianza-covarianza sui parametri:

$$\Sigma_{\theta} = \begin{bmatrix} \frac{V_{11}}{\sigma_{\theta_1}^2} & \frac{V_{12}}{\sigma_{\theta_1} \sigma_{\theta_2}} & \dots & \frac{V_{1N_{\theta}}}{\sigma_{\theta_1} \sigma_{\theta_{N_{\theta}}}} \\ \frac{V_{21}}{\sigma_{\theta_2} \sigma_{\theta_1}} & \frac{V_{22}}{\sigma_{\theta_2}^2} & \dots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{V_{N_{\theta}1}}{\sigma_{\theta_1} \sigma_{\theta_{N_{\theta}}}} & \dots & \dots & \frac{V_{N_{\theta}N_{\theta}}}{\sigma_{\theta_{N_{\theta}}}^2} \end{bmatrix} \quad (2.12)$$

2.2.2 Criteri di progettazione

La progettazione dell'esperimento si basa essenzialmente sulla minimizzazione di un'opportuna metrica ψ della matrice \mathbf{V}_{θ} di varianza-covarianza parametrica o, in altre parole, sulla massimizzazione di un'opportuna metrica ψ della matrice di informazione \mathbf{H}_{θ} .

I criteri di progettazione più noti sono i cosiddetti criteri classici alfabetici, introdotti da Wolfowitz nel 1959 e definiti come:

- **Criterio D-ottimale:** utilizzando questo criterio la progettazione mira alla massimizzazione del determinante della matrice di informazione/minimizzazione del determinante della matrice di varianza/covarianza ($\psi(\mathbf{V}_{\theta}) = \det(\mathbf{V}_{\theta})$);
- **Criterio E-ottimale:** utilizzando questo criterio la progettazione mira alla massimizzazione del più piccolo autovalore della matrice di informazione/minimizzazione del più grande autovalore della matrice di varianza/covarianza ($\psi(\mathbf{V}_{\theta}) = \lambda_1(\mathbf{V}_{\theta})$);
- **Criterio A-ottimale:** utilizzando questo criterio la progettazione mira alla massimizzazione della traccia della matrice di informazione/ minimizzazione della traccia della matrice di varianza/covarianza ($\psi(\mathbf{V}_{\theta}) = \text{tr}(\mathbf{V}_{\theta})$).

La differenza fra i diversi metodi sopra descritti può essere compresa utilizzando un'interpretazione geometrica del problema: l'applicazione al set parametrico della matrice di varianza-covarianza genera nello spazio dei parametri un iperellissoide i cui assi sono coincidenti con gli autovettori di \mathbf{V}_{θ} e il cui volume è uguale al determinante di \mathbf{V}_{θ} .

Come si può osservare in Figura 2.3, il criterio D-ottimale mira a ridurre il volume dell'iperellissoide, quello E-ottimale minimizza le dimensioni dell'asse maggiore, e quello A-ottimale cerca di ridurre le dimensioni delle diagonali del solido in cui è inscritto l'iperellissoide.

In generale il criterio più utilizzato tra i tre precedentemente descritti è il D-ottimale, grazie alla facile interpretazione geometrica, all'invarianza rispetto a particolari trasformazioni (es.

rescaling) applicate ai parametri, alla capacità di progettare esperimenti ottimali alterando un numero ristretto di condizioni operative.

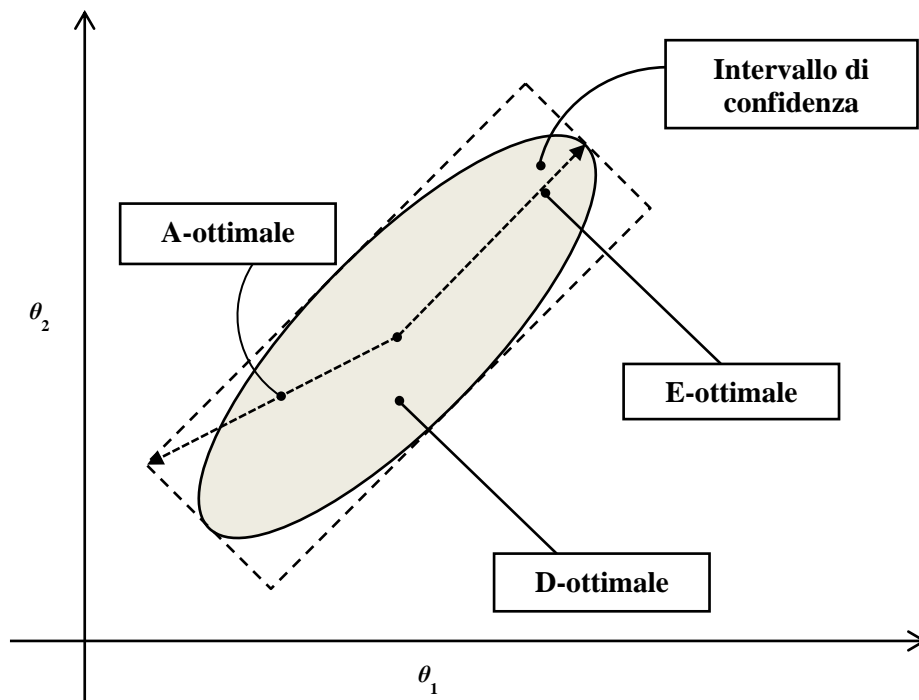


Figura 2.4 Interpretazione geometrica dei criteri standard di design degli esperimenti; l'area in grigio rappresenta l'intervallo di confidenza dei parametri, in genere al 90% o al 95% (Franceschini e Macchietto, 2008)

Il criterio E-ottimale agisce all'opposto del D-ottimale, dando importanza solo ad alcune direzioni di variabilità parametrica; l'utilizzo di questo approccio risulta però fortemente condizionato dall'aumento del costo computazionale, dal momento che è necessario il calcolo degli autovalori della matrice di varianza-covarianza.

Infine, per quanto riguarda il criterio A-ottimale, si evidenzia come questo non porti a progettazioni ottimali nel caso di alta correlazione parametrica: esso infatti, agendo unicamente sui termini diagonali della matrice di informazione, trascura l'informazione legata ai termini extradiagonali con il rischio di portare alla realizzazione di esperimenti non informativi (Munack e Posten, 1989).

Per ovviare ai diversi problemi relativi all'utilizzo di ciascuno di questi metodi standard sono stati creati altri metodi, tra cui si menziona il criterio SV-ottimale che cerca di massimizzare il valore di un determinato autovalore della matrice di informazione.

2.2.3 Realizzazione di esperimenti in silico

La realizzazione di un esperimento *in silico* è spesso simulata con opportuni software in grado di descrivere il comportamento del sistema reale utilizzando un modello deterministico caratterizzato dai parametri veri, in grado di rappresentare in maniera precisa e accurata il sistema studiato.

A livello pratico le risposte $\mathbf{y}(t)$ sono valutate solo in certi istanti, in altre parole negli N_{sp} tempi di campionamento scelti a seguito della progettazione; oltre a questo, per simulare con maggiore verosimiglianza la realtà, è opportuno introdurre per ogni misurazione sperimentale il rispettivo errore di misura.

Si assume che una misura sperimentale possa essere rappresentata con la formula:

$$\mathbf{y}(t) = \hat{\mathbf{y}}(t) + \boldsymbol{\eta}(t) \quad \forall t \in \mathbf{t}_{sp} \quad (2.13)$$

dove $\hat{\mathbf{y}}(t)$ è il vettore delle risposte predette dal modello e $\boldsymbol{\eta}(t)$ è un valore random estratto da una distribuzione normale con media nulla e varianza nota descritta tramite la matrice $\boldsymbol{\Sigma}_y$ costruita con un opportuno modello di varianza.

Tabella 2.1 Modelli di varianza

Modello	Descrizione Matematica	ω	γ
Mod. a varianza costante	$\sigma_y^2 = \omega^2$	qualsiasi	0
Mod. a varianza relativa	$\sigma_y^2 = \omega^2(\hat{y}^2)$	qualsiasi	1
Mod. a varianza eteroschedastica	$\sigma_y^2 = \omega^2(\hat{y}^2)^\gamma$	qualsiasi	[0,1]
Mod. a varianza lineare	$\sigma_y^2 = \alpha \hat{y} + \beta$ con qualsiasi valore possibile per α e β		

I modelli più diffusi sono quelli riportati in Tabella 2.1: si precisa che σ_y è la varianza sulle misure relative alla variabile y , ω è la deviazione standard sulla misura e γ è la costante eteroschedastica.

Per semplicità si utilizzerà nel prosieguo della tesi il modello a varianza costante, nonostante non sia noto a priori il modello che riesce a descrivere meglio la varianza dei dati sperimentali.

2.2.4 Stima parametrica

Nel momento in cui si ottengono dei dati da esperimenti realizzati o simulati, si ha a disposizione una serie di dati sulle risposte del modello; questi dati sono utilizzati nella fase di

stima, la quale ha lo scopo di individuare il valore da attribuire ai parametri per regredire in maniera ottimale i dati sperimentali acquisiti, fornendo le statistiche sulla stima effettuata.

La qualità della stima si basa sulla compresenza di due proprietà: l'accuratezza, cioè la corrispondenza del dato desumibile da misure sperimentali con il dato reale, e la precisione, cioè la dispersione minima delle misure rispetto alla media campionaria.

Le principali tecniche utilizzate in Letteratura (Bard, 1974) per la stima sono il metodo dei minimi quadrati (LS, *least squares*) e quello della massima verosimiglianza (ML, *maximum likelihood*).

Il primo metodo, utilizzabile per testare l'adeguatezza del modello alla regressione dei dati sperimentali, minimizza la somma dei quadrati dei residui pesati, denominata *SSWR* (*sum of squares of weighted residuals*) e calcolata tramite la formula:

$$SSWR = \sum_{i=1}^{N_{sp}} \left(\frac{y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\sigma_{r,i}} \right)^2 \quad (2.14)$$

Se i residui sono rappresentabili con una distribuzione normale e il modello è lineare, o linearizzabile in un intorno del minimo della funzione *SSWR*, si può affermare che *SSWR* assume una distribuzione χ^2 con $v = N_{sp} - N_{\theta}$ gradi di libertà. Qualora il valore di χ^2 risulti minore del valore calcolato per una distribuzione con v gradi e per un prestabilito valore di confidenza, si può affermare che il modello è in grado di garantire un buon fitting.

Il metodo di massima verosimiglianza (ML) invece si basa sulla minimizzazione della funzione di massima verosimiglianza $L_r(\boldsymbol{\theta})$ definita come:

$$L_r(\boldsymbol{\theta}) = \prod_{i=1}^{N_{sp}} \frac{1}{\sigma_{r,i} \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\sigma_{r,i}} \right)^2 \right] \quad (2.15)$$

Da notare come la funzione coincida con *SSWR* nel caso particolare in cui la distribuzione degli scarti sia assunta normale (media nulla, varianza costante); rielaborando l'espressione si ottiene infatti:

$$-2 \ln(L_r(\boldsymbol{\theta})) = \sum_{i=1}^{N_{sp}} \left(\frac{y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\sigma_{r,i}} \right)^2 + 2 \sum_{i=1}^{N_{sp}} \ln(\sigma_{r,i}) \quad (2.16)$$

da cui si può evincere che il primo addendo al secondo membro coincide con *SSWR*; il secondo addendo invece permette di calcolare con precisione la funzione ML anche nel caso

in cui l'errore del modello non sia distribuito normalmente, ma dipendente dal valore assunto dalla risposta \mathbf{y} .

Per valutare la precisione della stima sui parametri si utilizza di solito il metodo del t_{value} applicato ad ogni parametro; in pratica si calcola la quantità:

$$t_i = \frac{\hat{\theta}_i}{\sqrt{V_{ii}}} \quad (2.17)$$

dove V_{ii} è l' i -esimo elemento diagonale della matrice di varianza-covarianza parametrica.

Tale valore viene successivamente confrontato con il valore di t ottenuto da una distribuzione di Student con $\nu = N_{sp} - N_{\theta}$ gradi di libertà: nel caso in cui quest'ultimo valore sia minore rispetto al valore calcolato tramite la (2.15) si può affermare che la stima effettuata è precisa. Un altro strumento per accertare l'affidabilità della stima parametrica è la valutazione dell'ampiezza dell'intervallo di confidenza, la quale deve rispettare il vincolo espresso tramite la formula:

$$(\boldsymbol{\theta} - \hat{\boldsymbol{\theta}})^T \mathbf{Q}^T \mathbf{Q} (\boldsymbol{\theta} - \hat{\boldsymbol{\theta}}) \leq N_{\theta} \cdot s^2 \cdot F(\alpha, N_{\theta}, N_{sp} - N_{\theta}) \quad (2.18)$$

dove s^2 è la stima della varianza sulle misure e F è la distribuzione statistica di Fisher con $(1 - \alpha)$ pari al livello di significatività desiderato.

2.3 Progettazione ottimale di esperimenti basata su tecniche di riparametrizzazione

L'idea sviluppata in questa tesi consiste nel proporre un nuovo metodo di progettazione per affrontare il problema di identificabilità parametrica che spesso si incontra a causa dell'elevata correlazione presente tra due o più parametri del modello.

Il metodo non altera la struttura del modello, ma a partire dai parametri di quest'ultimo crea un nuovo set parametrico al fine di generare una nuova matrice di informazione con un maggiore contenuto informativo in quanto basata sul calcolo di sensitività rispetto ai nuovi parametri.

Il nuovo set $\boldsymbol{\theta}^*$ può essere ottenuto tramite l'espressione:

$$\boldsymbol{\theta}^* = h(\boldsymbol{\theta}) \quad (2.19)$$

dove $h(\boldsymbol{\theta})$ è una funzione invertibile in grado di creare un nuovo vettore parametrico che abbia sia significato fisico, sia capacità di non eliminare parte dell'informazione presente nel modello.

L'invertibilità è una condizione necessaria da imporre a $h(\boldsymbol{\theta})$ in quanto, una volta stimato il set $\boldsymbol{\theta}^*$, si può stimare indirettamente il set $\boldsymbol{\theta}$ attraverso la formula:

$$\boldsymbol{\theta} = h^{-1}(\boldsymbol{\theta}^*) \tag{2.20}$$

La scelta di $h(\boldsymbol{\theta})$ dipende dal tipo di modello oggetto di studio e dalle problematiche specifiche emerse da una progettazione preliminare insoddisfacente effettuata con criteri standard. Allo stato attuale non esiste un criterio univoco di scelta che permetta di associare a una determinata causa di non identificabilità una specifica forma ottimale della funzione $h(\boldsymbol{\theta})$; pertanto è necessario testare con procedure "trial and error" l'effettiva validità del metodo.

Una volta che $h(\boldsymbol{\theta})$ è stata selezionata si può dunque procedere al calcolo della nuova matrice di sensitività dinamica $\mathbf{Q}_r^*(t)$ definita secondo la formula:

$$\mathbf{Q}_r^*(t) = \begin{bmatrix} \left. \frac{\partial y_r}{\partial \theta_1^*} \right|_{t_0} & \dots & \left. \frac{\partial y_r}{\partial \theta_{N_\theta}^*} \right|_{t_0} \\ \dots & \ddots & \dots \\ \left. \frac{\partial y_r}{\partial \theta_1^*} \right|_{t_{N_{sp}}} & \dots & \left. \frac{\partial y_r}{\partial \theta_{N_\theta}^*} \right|_{t_{N_{sp}}} \end{bmatrix} \tag{2.21}$$

A questo punto, sostituendo l'espressione (2.21) nella (2.6) è possibile ricavare la nuova matrice di riparametrizzazione, indicata con il simbolo \mathbf{H}_{θ^*} , in quanto relativa al nuovo set parametrico $\boldsymbol{\theta}^*$.

In questo lavoro si decide di creare il nuovo set parametrico, indicato con il vettore $\boldsymbol{\theta}^*$, come prodotto tra una matrice \mathbf{A} , definita nel seguito come matrice di riparametrizzazione, e $\boldsymbol{\theta}$, set dei parametri del modello:

$$\boldsymbol{\theta}^* = h(\boldsymbol{\theta}) = \mathbf{A} \cdot \boldsymbol{\theta} \tag{2.22}$$

Il problema della scelta dei parametri $\boldsymbol{\theta}^*$ ottimali si sposta quindi sulla scelta di un'opportuna matrice \mathbf{A} ; allo schema originario di progettazione degli esperimenti presente in Figura 2.2 si deve quindi aggiungere un ulteriore step, la cui collocazione nell'algoritmo di progettazione non è univoca e porta a differenti progettazioni e a conseguenti differenti problematiche.

Una possibile soluzione consiste (Figura 2.5a) nel selezionare la matrice \mathbf{A} basandosi unicamente su un vettore dell'esperimento $\boldsymbol{\phi}_0$ deciso a priori e sulla stima iniziale dei parametri $\boldsymbol{\theta}_0$, mantenendo il nuovo set di parametri $\boldsymbol{\theta}^*$ generato da \mathbf{A} per tutti gli step successivi della progettazione.

Questo approccio, che si può definire *offline*, richiede dunque un solo step preliminare prima di passare alla procedura standard di progettazione; un aspetto negativo consiste nel fatto che

la matrice \mathbf{A} non è ottimizzata in funzione del vettore dell'esperimento $\boldsymbol{\varphi}$ ottenuto dal design, pur dipendendone direttamente, dal momento che non viene ricalcolata dopo avere compiuto la prima iterazione.

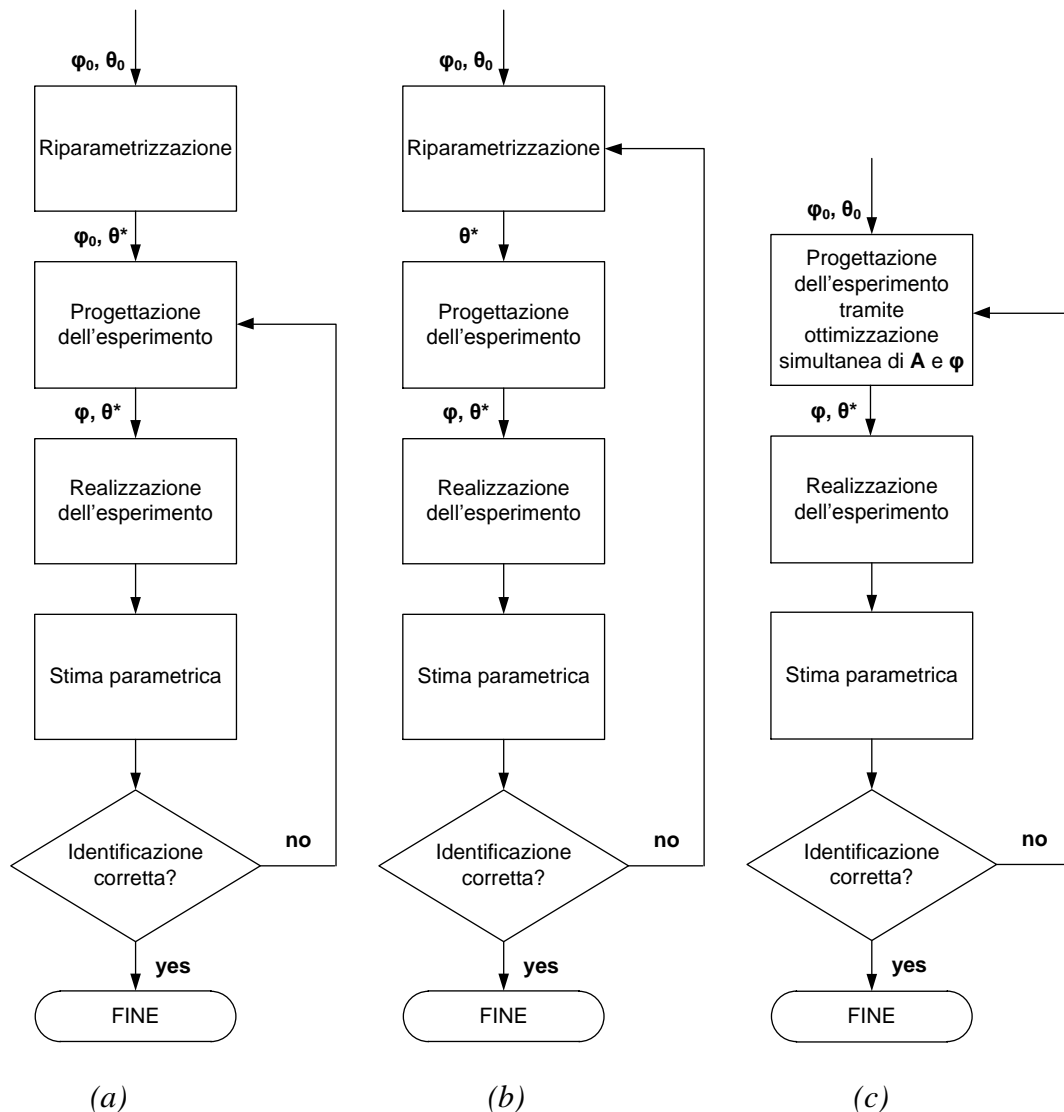


Figura 2.5 Schema adottato per la progettazione dell'esperimento basata su tecniche di riparametrizzazione: (a) metodo offline, (b) metodo sequential, (c) metodo optimal

Per contrastare quest'aspetto negativo si può procedere alternativamente seguendo il metodo rappresentato in Figura 2.5b, definito *sequential*. In questo caso le ottimizzazioni della matrice \mathbf{A} e del vettore dell'esperimento $\boldsymbol{\varphi}$ avvengono iterativamente fino al raggiungimento della stima desiderata: da notare tuttavia come la fase di riparametrizzazione del design, in cui si sceglie la matrice \mathbf{A} , e quella di design dell'esperimento, in cui si seleziona $\boldsymbol{\varphi}$, rimangono due ottimizzazioni distinte eseguite sequenzialmente ciascuna secondo i criteri standard descritti nel sottoparagrafo 2.2.2.

L'ultimo schema di riparametrizzazione, rappresentato in Figura 2.5c, unisce in un unico blocco la fase di design tramite un'ottimizzazione simultanea delle componenti di \mathbf{A} (in altre parole del set ottimale di parametri da stimare) e del vettore degli esperimenti $\boldsymbol{\varphi}$: questo metodo, definito *optimal*, è potenzialmente ideale in quanto facilmente automatizzabile una volta che si è inizializzato il problema; d'altro canto l'ottimizzazione contemporanea di un numero elevato di variabili può risultare pesante, se non addirittura impossibile dal punto di vista computazionale, soprattutto nel caso in cui la matrice di informazione abbia un set di autovalori con basso valore assoluto.

Prima di passare al capitolo successivo, che mette in luce i risultati ottenuti applicando alla progettazione degli esperimenti il metodo di riparametrizzazione *offline* descritto in questo paragrafo, si fornisce un semplice esempio di applicazione per comprendere le potenzialità di questo nuovo approccio.

2.3.1 Un esempio applicativo

Si consideri ad esempio la funzione logistica:

$$f(x(t)): \frac{dx(t)}{dt} = \theta_1 \left(1 - \frac{x(t)}{\theta_2} \right) x(t) \quad (2.23)$$

Questa funzione, proposta da Verhulst (1838), è utilizzata spesso per descrivere la crescita di una popolazione e trova applicazione in modelli di descrizione di sistemi biologici; in particolare $x(t)$ può rappresentare il numero di individui al tempo generico t , θ_1 la velocità di crescita intrinseca della popolazione e θ_2 il numero massimo di individui che possono essere presenti nel sistema.

Esplicitando l'equazione (2.23) si ottiene l'espressione per la variabile misurata $x(t)$:

$$x(t) = \frac{\theta_2 x_0 \exp(\theta_1 t)}{\theta_2 + x_0 (\exp(\theta_1 t) - 1)} \quad (2.24)$$

Il criterio standard di progettazione degli esperimenti si basa sul calcolo delle sensitività rispetto al set parametrico $\boldsymbol{\theta} = [\theta_1, \theta_2]$, in maniera da creare la matrice \mathbf{Q}_r e, conseguentemente, la matrice di informazione \mathbf{H}_θ . Nel caso in questione la matrice \mathbf{Q}_r assume la forma:

$$\mathbf{Q}_r(t) = \begin{bmatrix} \left. \frac{\partial x(t)}{\partial \theta_1} \right|_{t_0} & \left. \frac{\partial x(t)}{\partial \theta_2} \right|_{t_0} \\ \dots & \dots \\ \left. \frac{\partial x(t)}{\partial \theta_1} \right|_{t_{N_{sp}}} & \left. \frac{\partial x(t)}{\partial \theta_2} \right|_{t_{N_{sp}}} \end{bmatrix} \quad (2.25)$$

dove:

$$\frac{\partial x(t)}{\partial \theta_1} = \frac{\theta_2^2 x_0 \exp(\theta_1 t)}{x_0^2 \exp(2\theta_1 t) + 2\theta_2 x_0 \exp(\theta_1 t) + \theta_2^2} \quad (2.26)$$

$$\frac{\partial x(t)}{\partial \theta_2} = \frac{\theta_2^2 \exp(2\theta_1 t)}{x_0^2 \exp(2\theta_1 t) + 2\theta_2 x_0 \exp(\theta_1 t) + \theta_2^2} \quad (2.27)$$

Con il nuovo metodo di progettazione proposto la matrice di informazione viene calcolata a partire dalle matrici di sensitività relative a un nuovo set parametrico creato opportunamente a partire dal set di partenza $\boldsymbol{\theta} = [\theta_1, \theta_2]$. Assumendo, ad esempio, che \mathbf{A} sia pari a:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (2.28)$$

il nuovo set parametrico sarà dato dal vettore $\boldsymbol{\theta}^* = [\theta_1^*, \theta_2^*] = [\theta_1 + \theta_2, \theta_2]$ e la matrice di sensitività $\mathbf{Q}_r^*(t)$ rispetto al nuovo set parametrico diventerà:

$$\mathbf{Q}_r^*(t) = \begin{bmatrix} \left. \frac{\partial x(t)}{\partial \theta_1^*} \right|_{t_0} & \left. \frac{\partial x(t)}{\partial \theta_2^*} \right|_{t_0} \\ \dots & \dots \\ \left. \frac{\partial x(t)}{\partial \theta_1^*} \right|_{t_{N_{sp}}} & \left. \frac{\partial x(t)}{\partial \theta_2^*} \right|_{t_{N_{sp}}} \end{bmatrix} \quad (2.29)$$

dove:

$$\begin{aligned} \frac{\partial x(t)}{\partial \theta_1^*} &= D_{\boldsymbol{\theta}} f(x(t)) = \nabla f(x(t)) \cdot \boldsymbol{\theta} = \frac{\theta_2^2 x_0 \exp(\theta_1 t)}{x_0^2 \exp(2\theta_1 t) + 2\theta_2 x_0 \exp(\theta_1 t) + \theta_2^2} \cdot \theta_1 + \\ &+ \frac{\theta_2^2 \exp(2\theta_1 t)}{x_0^2 \exp(2\theta_1 t) + 2\theta_2 x_0 \exp(\theta_1 t) + \theta_2^2} \cdot \theta_2 \end{aligned} \quad (2.30)$$

$$\frac{\partial x(t)}{\partial \theta_2^*} = \frac{\partial x(t)}{\partial \theta_2} = \frac{\theta_2^2 \exp(2\theta_1 t)}{x_0^2 \exp(2\theta_1 t) + 2\theta_2 x_0 \exp(\theta_1 t) + \theta_2^2} \quad (2.31)$$

Si precisa che il termine $D_{\theta} f(x(t))$ presente nell'equazione (2.30) rappresenta la derivata direzionale della funzione $f(x(t))$ lungo il vettore θ ed è definito come:

$$D_{\theta} f(x(t)) = \lim_{h \rightarrow 0^+} \frac{f(x(t) + h\theta) - f(x(t))}{h} \quad (2.32)$$

A questo punto la progettazione viene effettuata inserendo la (2.29) al posto della (2.25) all'interno della (2.6), ottenendo in questa maniera la nuova matrice di informazione \mathbf{H}_{θ^*} ; dopo aver individuato il vettore dell'esperimento ϕ che permette di massimizzare un'opportuna misura di \mathbf{H}_{θ^*} , si passa alla stima parametrica di θ^* . Nel caso in cui quest'ultima sia soddisfacente, si può ricavare il valore del set iniziale θ attraverso la relazione:

$$\theta = [\theta_1^* - \theta_2^*, \theta_2^*] \quad (2.33)$$

Capitolo 3

Applicazione di tecniche di riparametrizzazione a un modello farmacologico

In questo capitolo verranno introdotte le problematiche legate all'identificabilità parametrica del modello farmacologico di Tam *et al.* (2005a). Dopo aver riportato alcuni risultati preliminari presenti nel suddetto articolo e alcune osservazioni presenti in Ballan (2011) che mettono in luce i problemi di identificabilità del modello, si propone di utilizzare il nuovo metodo di riparametrizzazione della progettazione finalizzato al miglioramento della stima parametrica.

3.1 Descrizione del modello

Il modello preso in considerazione è quello di Tam *et al.* (2005a), descritto dalle seguenti equazioni algebrico-differenziali:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dN(t)}{dt} = G(N(t)) - K(C_a(t), N(t)) \quad (3.1) \\ G(N(t)) = K_g \cdot \left[1 - \frac{N(t)}{N_{MAX}} \right] \cdot N(t) \quad (3.2) \\ K(C_a(t), N(t)) = \left[\frac{K_k \cdot C_a(t)^H}{C_a(t)^H + (\alpha \cdot C_{50,k})^H} \right] \cdot N(t) \quad (3.3) \\ \alpha = 1 + \beta \cdot (1 - \exp(-C_a(t) \cdot \tau \cdot t)) \quad (3.4) \end{array} \right.$$

dove:

- $N(t)$ rappresenta la concentrazione della coltura batterica in vitro ed è espressa in $[\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}]$;
- $G(N(t))$ è il termine di crescita naturale della coltura batterica in vitro;
- $K(C_a(t), N(t))$ rappresenta il decadimento della coltura batterica in vitro: questo termine è costituito da una modifica dell'equazione di Hill (1910) attraverso

l'introduzione di un contributo α che tiene conto dell'aumento temporale della popolazione batterica resistente all'antibiotico;

- $C_a(t)$ rappresenta la concentrazione di antibiotico somministrata.

Nella Tabella 3.1 sono riportati i sette parametri del modello con spiegazione del relativo significato fisico.

Tabella 3.1 Descrizione dei parametri del modello di Tam *et al.* (2005a)

Parametro	Dimensioni	Descrizione
K_g	$[h^{-1}]$	Velocità di crescita massima
N_{MAX}	$[cfu \cdot mL^{-1}]$	Carica batterica massima
K_k	$[h^{-1}]$	Velocità di morte massima
$C_{50,k}$	$[mg \cdot L^{-1}]$	Conc. di farmaco per cui la velocità di morte risulta dimezzata
H	$[-]$	Costante di sigmoidicità
β	$[-]$	Adattamento massimo
τ	$[L \cdot (mg \cdot h)^{-1}]$	Fattore di velocità d'adattamento

Il modello in esame descrive l'andamento temporale di una popolazione batterica ponendo in evidenza il fenomeno di ricrescita osservabile nello sviluppo di curve time-kill. L'obiettivo dell'articolo di Tam *et al.* (2005a) è stato quello di fornire informazioni quantitative sulla farmacodinamica degli antibiotici creando un modello che permettesse di superare l'imprecisione connessa all'uso dei classici indici farmacodinamici (*MIC*, *MBC*, *AUC/MIC*) descritti nel capitolo 1.

In questo modo si è potuta ottenere una relazione matematica in grado di descrivere l'andamento temporale della concentrazione batterica in funzione della concentrazione di antibiotico somministrata.

Le esperienze riportate sono state effettuate in particolare su un ceppo batterico di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, trattata con antibiotico Meropenem. All'inizio è stata misurata la *MIC* ed è stato preparato l'inoculo (10^8 cfu/mL) da inserire nel terreno di coltura.

La *MIC* ricavata dalle misure è risultata pari a 1 mg/L. Lo studio è stato effettuato in terreno liquido MHB per la durata di 24 ore, realizzando sei esperimenti durante i quali sono stati prelevati rispettivamente due campioni a sei istanti diversi. Le concentrazioni iniziali di antibiotico C_a utilizzate nei sei esperimenti sono state di 0, 0.25, 1, 4, 16 e 64 *MIC* e i campionamenti sono stati effettuati a 0, 2, 4, 8, 12 e 24 ore; i campioni prelevati sono stati coltivati quantitativamente su Mueller-Hinton agar per permettere di determinare il numero di cellule vive, con un limite di rilevazione pari a 400 cfu/mL.

La stima parametrica del modello è stata effettuata attraverso una tecnica di analisi della popolazione tramite il programma NAPG (*non parametric adaptive grid*, Leary *et al.*, 2001); in Tabella 3.2 si riportano le stime parametriche ottenute.

Tabella 3.2 Stime parametriche ottenute nell'articolo di Tam *et al.* (2005a)

Esperimento	C_a [mg·L ⁻¹]	$C_{50,k}$ [mg·L ⁻¹]	K_g [h ⁻¹]	K_k [h ⁻¹]	H [-]	$N_{MAX} \cdot 10^9$ [cfu·mL ⁻¹]	β [-]	τ [L·mg ⁻¹ ·h ⁻¹]
1	0	3.53	0.31	4.08	1.48	2.39	6.64	0.011
2	0.25	0.44	0.61	9.6	3.82	9.99	3.79	0.021
3	1	3.53	0.31	4.08	1.48	2.29	6.64	0.011
4	4	0.74	2.31	3.12	1.67	9.99	4.48	0.0069
5	16	2.61	2.85	3.41	7.74	9.99	4.85	0.0051
6	64	2.9	2.58	3.95	0.79	9.99	8.7	0.0014
valor medio	/	2.29	1.5	4.71	2.83	5.85	5.85	0.0095
σ stima	/	1.25	1.1	2.22	2.39	3.64	1.66	0.0063

Osservando i risultati sopra riportati si può notare che la stima parametrica ottenuta non è precisa: come sostenuto da Ballan (2011), questo risultato può essere causato dall'aver utilizzato un modello di popolazione per effettuare la stima. Dal momento che il sistema cui viene applicato il modello è sempre lo stesso per ogni esperimento, è ragionevole imporre una variabilità nulla ai parametri e considerare i vari esperimenti come prove condotte parallelamente su uno stesso sistema.

Oltre a questo, dallo studio in merito alla correlazione delle sensitività dei parametri per gli esperimenti realizzati in Tabella 3.3 sono stati individuati esperimenti per i quali la correlazione tra alcuni parametri risultava pari a ± 1 , fatto che pregiudica dal punto di vista teorico la capacità di identificare correttamente i parametri del modello.

Tabella 3.3 Stime parametriche ottenute nell'articolo di Tam *et al.* (2005a). Nei casi in cui è riportato il simbolo '/' si afferma che, per il dato esperimento, il parametro considerato non presenta correlazione con altri parametri pari a ± 1

Esperimento	$C_{50,k}$ [mg·L ⁻¹]	K_g [h ⁻¹]	K_k [h ⁻¹]	H [-]	$N_{MAX} \cdot 10^9$ [cfu·mL ⁻¹]	β [-]	τ [L·mg ⁻¹ ·h ⁻¹]
Esperimento n°1	K_k, H	/	$K_k, C_{50,k}$	$K_k, C_{50,k}$	/	τ	β
Esperimento n°2	K_k	/	$C_{50,k}$	/	/	τ	β
Esperimento n°3	K_k	/	$C_{50,k}$	/	/	/	/
Esperimento n°5	/	/	K_g	/	/	/	/

3.1.1 Considerazioni preliminari

Seguendo la procedura presente in Ballan (2011) si è passati all'utilizzo di tecniche numeriche per verificare l'eventuale identificabilità locale; scegliendo come valori veri dei parametri quelli riportati in Tabella 3.4 e rinominando i parametri come descritto in Tabella 3.5, sono stati simulati con il software gPROMS[®] diversi esperimenti imponendo una durata complessiva di 24 ore e un inoculo batterico iniziale pari a $3.03 \cdot 10^7$ cfu/mL, variando unicamente la concentrazione iniziale di antibiotico C_a somministrata nel terreno di coltura (MHB). Il sistema è mantenuto a $T = 35^\circ\text{C}$.

Tabella 3.4 Caratteristiche del set parametrico utilizzato per la simulazione in vitro dell'esperimento reale

	$C_{50,k}$	K_g	K_k	H	N_{MAX}	β	τ
Valore vero	0.888	1.848	3.744	1.336	7.2	3.58	0.0083
Min	0.4	0.3	3	0.5	2	3	0.0014
Max	4	3	10	8	11	9	0.021
Valore vero normalizzato	1	1	1	1	1	1	1

Tabella 3.5 Ridenominazione dei parametri del modello

	$C_{50,k}$	K_g	K_k	H	N_{MAX}	β	τ
Simbolo	θ_1	θ_2	θ_3	θ_4	θ_5	θ_6	θ_7

Utilizzando il test di identificabilità locale basato sul calcolo della correlazione tra le colonne della matrice di stimabilità \mathbf{P}_E (definita nell'equazione 2.3) sono stati ottenuti risultati insoddisfacenti per tutte le concentrazioni considerate. Nelle Tabelle 3.6, 3.7, 3.8 si riportano in particolare i valori ricavati imponendo concentrazioni iniziali di antibiotico pari a $C_a = 0.1, 1, 2$ mg/L e supponendo di conoscere il valore reale dei parametri.

Tabella 3.6 Matrice di correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E ($C_a = 0.1$ mg/L, parametri 'veri'). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.9620	-1.0000	0.9999	-0.5325	-0.4260	-0.4259
s_2	0.9620	1.0000	-0.9620	0.9607	-0.7425	-0.5335	-0.5339
s_3	-1.0000	-0.9620	1.0000	-0.9999	0.5325	0.4274	0.4273
s_4	0.9999	0.9607	-0.9999	1.0000	-0.5279	-0.4162	-0.4161
s_5	-0.5325	-0.7425	0.5325	-0.5279	1.0000	0.6635	0.6651
s_6	-0.4260	-0.5335	0.4274	-0.4162	0.6635	1.0000	1.0000
s_7	-0.4259	-0.5339	0.4273	-0.4161	0.6651	1.0000	1.0000

Tabella 3.7 Matrice di correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E ($C_a = 1$ mg/L, parametri 'veri'). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.9997	-0.9991	0.8153	0.5745	0.9374	0.9427
s_2	0.9997	1.0000	-0.9981	0.8042	-0.5560	-0.9307	-0.9363
s_3	-0.9991	-0.9981	1.0000	-0.8239	0.5325	0.4274	0.4273
s_4	0.8153	0.8042	-0.8239	1.0000	0.8884	0.9659	0.9617
s_5	0.5745	-0.5560	-0.5998	0.8884	1.0000	0.7897	0.7806
s_6	0.9374	-0.9307	-0.9420	0.9659	0.7897	1.0000	0.9999
s_7	0.9427	-0.9363	-0.9469	0.9617	0.7806	0.9999	1.0000

Tabella 3.8 Matrice di correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E ($C_a = 2$ mg/L, parametri 'veri'). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.9996	-0.9968	-0.9584	0.5038	0.9876	0.9907
s_2	0.9996	1.0000	-0.9987	-0.9663	0.5235	0.9826	0.9862
s_3	-0.9968	-0.9987	1.0000	0.9781	-0.5521	-0.9719	-0.9766
s_4	-0.9584	-0.9663	0.9781	1.0000	-0.6480	-0.9019	-0.9109
s_5	0.5038	0.5235	-0.5521	-0.6480	1.0000	0.4016	0.4115
s_6	0.9876	0.9826	-0.9719	-0.9019	0.4016	1.0000	0.9997
s_7	0.9907	0.9862	-0.9766	-0.9109	0.4115	0.9997	1.0000

Come si può notare la correlazione esistente tra le colonne di \mathbf{P}_E risulta molto elevata per tutti e tre i casi; in particolare si segnala la correlazione tra le colonne relative ai parametri θ_6 e θ_7 che si mantiene praticamente pari a 1 indipendentemente dal valore di C_a utilizzato.

Proseguendo con lo studio del modello si nota, come evidenziato in Figura 3.1, che a C_a diverse si ottengono andamenti totalmente differenti; a $C_a = 0.1$ mg/L si ha solo crescita batterica, a $C_a = 2$ mg/L si ha solo morte cellulare, a $C_a = 1$ mg/L si osserva il fenomeno della ricrescita batterica.

Questo ha portato a pensare che, nonostante ciascun esperimento da solo non portasse all'identificazione parametrica del modello, l'eventuale conduzione in parallelo potesse renderla possibile.

Come si può notare in Tabella 3.9 la combinazione dei tre esperimenti sopra descritti porta a una diminuzione della correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E eccezion fatta per la correlazione tra s_6 e s_7 che risulta prossima a 1: questo potrebbe comunque pregiudicare l'identificabilità del modello e suggerisce l'applicazione di nuove tecniche che possano eliminare questo problema.

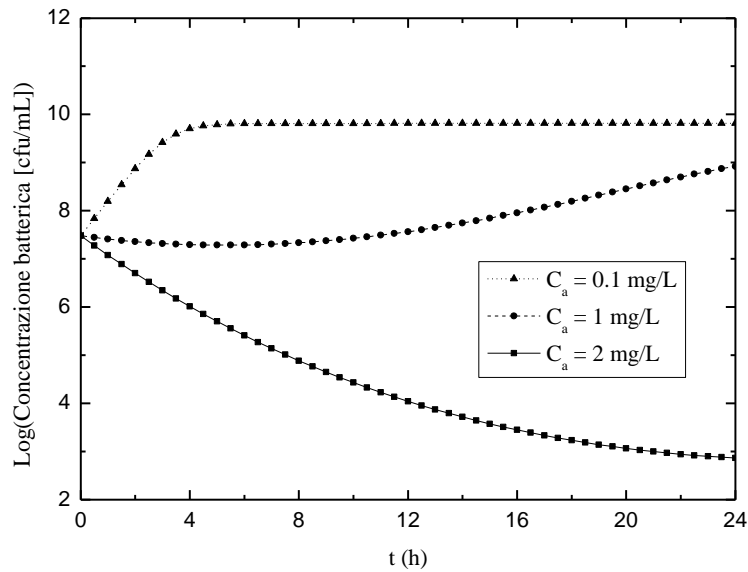


Figura 3.1 Profili di concentrazione per $C_a = 0.1$ mg/L, $C_a = 1$ mg/L, $C_a = 2$ mg/L

Tabella 3.9 Matrice di correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E (tre esperimenti in parallelo, parametri 'veri'). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.9965	-0.9695	-0.5007	-0.5771	0.9364	0.9461
s_2	0.9965	1.0000	-0.9844	-0.5627	-0.5985	0.9486	0.9570
s_3	-0.9695	-0.9844	1.0000	0.6940	0.6025	-0.9618	-0.9671
s_4	-0.5007	-0.5627	0.6940	1.0000	-0.4602	-0.6539	-0.6429
s_5	-0.5771	-0.5985	0.6025	0.4602	1.0000	-0.4532	-0.4616
s_6	0.9364	0.9486	-0.9618	-0.6539	-0.4532	1.0000	0.9994
s_7	0.9461	0.9570	-0.9671	-0.6429	-0.4616	0.9994	1.0000

3.2 Progettazione dell'esperimento basata su tecniche di riparametrizzazione

L'idea sviluppata in questa tesi consiste nell'affrontare il problema di identificabilità parametrica attraverso la costruzione di un opportuno set di parametri fittizi, dipendente dai parametri del modello, che sia stimabile con accuratezza, in modo da poter ricavare a ritroso una stima accurata anche di questi ultimi.

Come già precisato nel Capitolo 2, il metodo non consiste in una riparametrizzazione del modello così come intesa in Letteratura (Schwaab *et al.*, 2008) in quanto non altera la struttura del modello: il nuovo set parametrico è utilizzato unicamente al fine di creare una nuova matrice di informazione basata sul calcolo di sensitività rispetto ai nuovi parametri.

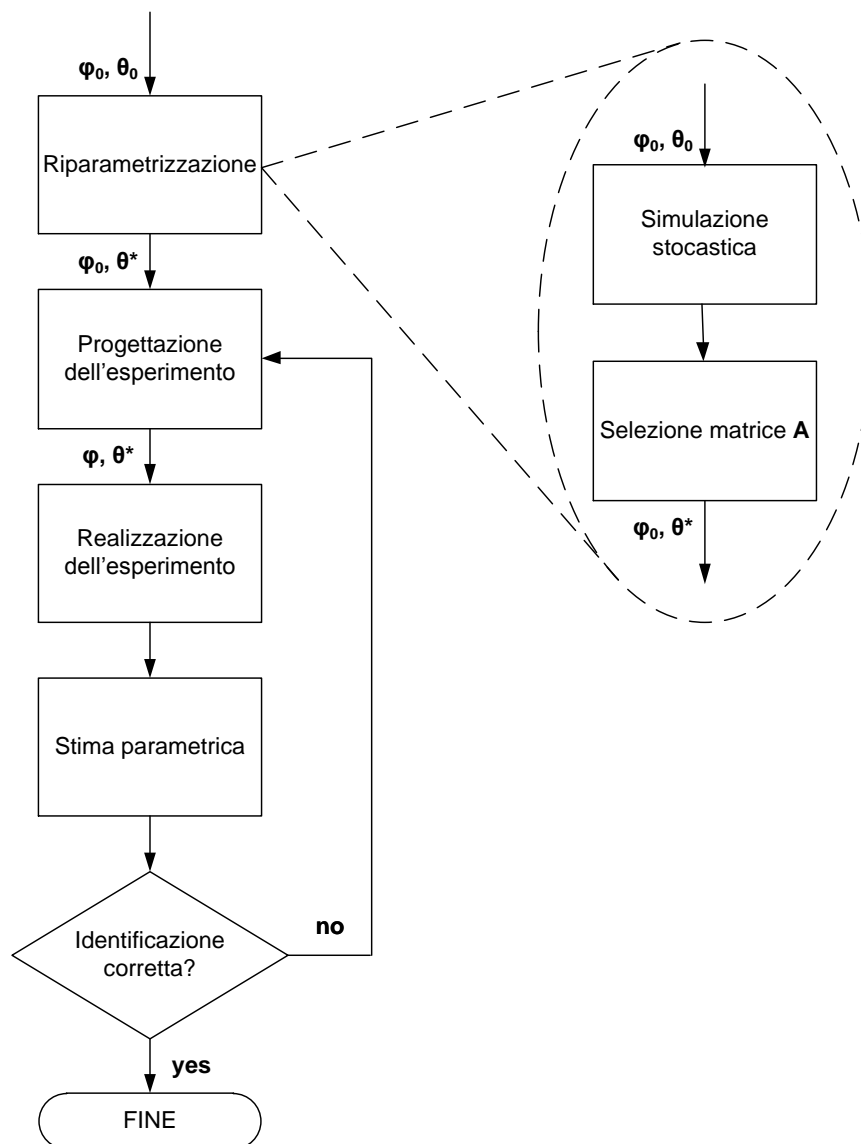


Figura 3.2 Schema offline adottato per la progettazione dell'esperimento basata su tecniche di riparametrizzazione

Come già anticipato nel capitolo precedente, si è deciso di creare il nuovo set di parametri θ^* come prodotto matrice-vettore tra \mathbf{A} , definita come matrice di riparametrizzazione, e θ , vettore dei parametri del modello; a questo punto il problema si è spostato sulla creazione e sulla selezione di un'opportuna matrice \mathbf{A} che mettesse in relazione i due set parametrici nella maniera più semplice possibile, ma garantendo al tempo stesso il risultato atteso.

Si è seguito l'approccio *offline* descritto nel paragrafo 2.3: in pratica si è scelta una matrice \mathbf{A} ottimale a partire dal set φ_0 e θ_0 in grado di generare il nuovo set parametrico θ^* e si è deciso di mantenere fisso il suo valore per le tappe successive della progettazione.

Lo schema logico seguito per lo step di riparametrizzazione, come si può notare osservando la Figura 3.2, è costituito da due fasi: la prima prevede la simulazione stocastica di n scenari distinti a partire dal vettore dell'esperimento $\boldsymbol{\varphi}_0$ di partenza (che nel caso in questione comprende unicamente il valore di C_a e i tempi di campionamento \mathbf{t}_{sp}); la seconda consiste nell'applicazione di un opportuno meccanismo di scelta della matrice \mathbf{A} da utilizzare nella fase di design successiva.

Per quanto concerne la seconda fase si fa presente che il criterio di selezione rappresenta un ulteriore grado di libertà: nel caso in questione si è cercato di individuare la matrice \mathbf{A} in grado di massimizzare il determinante della matrice di informazione \mathbf{H}_{θ^*} (in altre parole, per la scelta del set $\boldsymbol{\theta}^*$ ottimale si è utilizzato il criterio D-ottimale descritto per la progettazione standard di esperimenti).

Questa scelta è stata dettata dalla volontà di unire in un'unica funzione obiettivo la massimizzazione dell'informazione data da \mathbf{H}_{θ^*} e la capacità di creare un set parametrico identificabile $\boldsymbol{\theta}^*$: quest'ultima affermazione è spiegabile osservando che la matrice di stimabilità \mathbf{P}_E coincide con la matrice \mathbf{Q} , nel caso in cui si abbia una sola variabile controllata e campionamento continuo; la massimizzazione del determinante di \mathbf{H}_{θ^*} è quindi, indirettamente, anche un test di identificabilità per il nuovo set parametrico.

In seguito si presentano i risultati ottenuti dall'applicazione di questo metodo al modello di Tam *et al.* (2005a).

3.2.1 Stima parametrica basata su tre esperimenti in parallelo

Dal momento che la realizzazione simultanea di esperimenti (vedi Tabella 3.9) porta alla diminuzione della correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E (eccezion fatta per la correlazione tra s_6 e s_7 che risulta prossima a 1) rispetto al caso di esperimento singolo, si è applicato il metodo di riparametrizzazione della progettazione al caso di tre esperimenti condotti in parallelo.

Nell'Appendice 1 si riportano per completezza le stime parametriche ottenute per esperimenti singoli con campionamento continuo, le quali mostrano l'effettiva difficoltà di identificare i parametri con un solo esperimento, pur utilizzando il metodo di riparametrizzazione; i valori di t_{value} risultano infatti insoddisfacenti per tutti i parametri, denotando un'incertezza altissima sulla stima che si può ottenere.

Come primo tentativo di riparametrizzazione si è pensato di ideare una matrice \mathbf{A} invertibile con componenti diagonali unitarie e componenti extradiagonali pari a 0 o a 1; in pratica il nuovo set parametrico si può esprimere come:

$$\theta_i^* = \sum_{j=1}^7 a_{ij} \cdot \theta_j \quad , \text{ per } i = 1, \dots, 7 \quad (3.5)$$

dove a_{ij} è la componente ij -esima della matrice \mathbf{A} .

La condizione di invertibilità su \mathbf{A} è necessaria in quanto, una volta stimati i parametri $\boldsymbol{\theta}^*$, per avere una stima relativa al set di partenza è necessario effettuare l'operazione: $\boldsymbol{\theta} = \mathbf{A}^{-1} \cdot \boldsymbol{\theta}^*$. Dal momento che il problema di identificabilità per il modello di Tam *et al.* (2005a) risulta prettamente legato ai parametri θ_6 e θ_7 , si è optato per una costruzione di \mathbf{A} come quella rappresentata dall'espressione (3.6); essa prevede unicamente la variazione degli ultimi due parametri, lasciando inalterati i primi cinque, in quanto già facilmente stimabili secondo Ballan (2011).

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ a_{6,1} & a_{6,2} & a_{6,3} & a_{6,4} & a_{6,5} & 1 & a_{6,7} \\ a_{7,1} & a_{7,2} & a_{7,3} & a_{7,4} & a_{7,5} & a_{7,6} & 1 \end{bmatrix} \quad (3.6)$$

3.2.1.1 Caso continuo

Alla luce di quanto detto, si è quindi pensato di simulare $n = 100$ scenari in ciascuno dei quali vengono effettuati tre esperimenti in parallelo con campionamento continuo ($C_{a,1} = 0.1$ mg/L, $C_{a,2} = 1$ mg/L, $C_{a,3} = 2$ mg/L).

Si generano le componenti della matrice \mathbf{A} di ogni scenario tramite una distribuzione random di valori interi pari a 0 o a 1; in particolare si utilizza la funzione $\text{INT}(\text{UNIFORM}(0, 2))$ di gPROMS[®]. Al termine della simulazione si seleziona la matrice \mathbf{A} in grado di massimizzare la somma dei determinanti delle tre matrici di informazione \mathbf{H}_{θ^*} .

In questo caso particolare, dato il valore estremamente basso del determinante, si calcola il prodotto dei primi 5 autovalori della matrice di informazione \mathbf{H}_{θ^*} per ognuno dei tre esperimenti e in seguito si valuta la somma di questi tre valori come funzione obiettivo.

$$\text{funzione obiettivo} = \sum_{j=1}^{N \text{ exp}} \prod_{i=1}^5 \lambda_{i,j} \quad (3.7)$$

Il risultato è quello riportato in Figura 3.3. Si può notare come lo scenario ottimale, dopo aver escluso gli scenari per cui \mathbf{A} risulta non invertibile, risulta il numero 23.

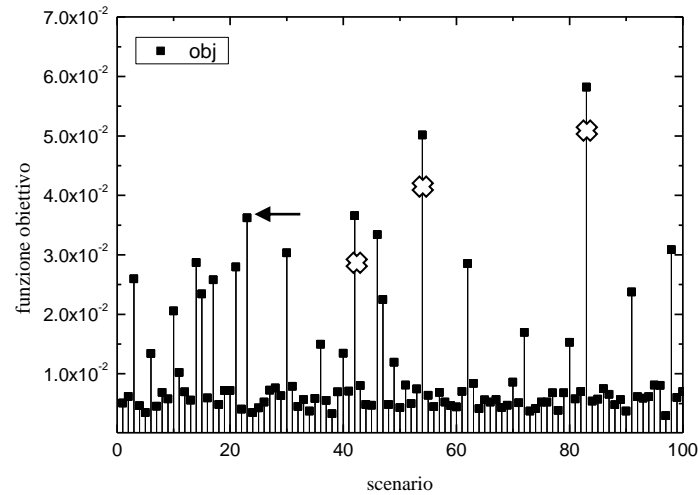


Figura 3.3 Simulazione stocastica per tre esperimenti in parallelo: (a) funzione obiettivo = (3.7): la freccia nera indica lo scenario ottimale, le croci bianche indicano gli scenari esclusi a causa della non invertibilità della matrice \mathbf{A} generata

La matrice \mathbf{A} ottenuta risulta:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.8)$$

Prima di effettuare la stima parametrica si passa al calcolo della matrice di correlazione fra le colonne di \mathbf{P}_E in maniera da sondare l'identificabilità parametrica. Dall'osservazione della Tabella 3.10 e dal confronto con la Tabella 3.9 appare evidente che la correlazione tra le colonne s_6 e s_7 risulta notevolmente diminuita, suggerendo un probabile esito positivo di un'eventuale stima.

Tabella 3.10 Matrice di correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E (caso riparametrizzato; tre esperimenti in parallelo)

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.9965	-0.9695	-0.5007	-0.5771	0.9979	0.8938
s_2	0.9965	1.0000	-0.9844	-0.5627	-0.5985	0.9917	-0.9236
s_3	-0.9695	-0.9844	1.0000	0.6940	0.6025	-0.9552	0.9728
s_4	-0.5007	-0.5627	0.6940	1.0000	-0.4602	-0.4574	0.8261
s_5	-0.5771	-0.5985	0.6025	0.4602	1.0000	-0.5598	0.6444
s_6	0.9979	0.9917	-0.9552	-0.4574	-0.5598	1.0000	-0.8680
s_7	0.8938	-0.9236	0.9728	0.8261	0.6444	-0.8680	1.0000

A questo punto si procede con il confronto fra la stima parametrica del caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$) e quella del caso riparametrizzato. In entrambi i casi si impone un campionamento continuo e un valore di $\omega = 0.02$ sul modello dell'errore di misura. Anche in questo caso si impone un valore iniziale della stima parametrica $\hat{\boldsymbol{\theta}}^*$ uguale al valore vero normalizzato di $\boldsymbol{\theta}^*$, in maniera da valutare l'efficacia del metodo a prescindere dall'incertezza iniziale sulla stima parametrica. La Tabella 3.11 rappresenta il confronto fra la stima dei parametri ottenuta per il caso base e quella relativa al caso riparametrizzato, con relativa accuratezza espressa sotto forma di $t_{\text{value}} 95\%$; Le Tabelle 3.12 e 3.13 mostrano invece il confronto tra la correlazione parametrica esistente nei due casi.

Tabella 3.11 Confronto fra le stime parametriche ottenute nel caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$) e quelle ottenute nel caso riparametrizzato (3 esperimenti in parallelo con campionamento continuo). Si evidenziano in corsivo i termini che hanno subito un netto miglioramento tramite il metodo di riparametrizzazione.

Parametro		Valore vero normalizzato		Stima		St.deviation		$t_{\text{value}} 95\%$	
base	rip	base	rip	base	rip	base	rip	base	rip
θ_1	θ_1^*	1	1	0.99329	0.9924	0.01868	0.01904	26.9	26.53
θ_2	θ_2^*	1	1	1.0056	1.0052	0.01146	0.01147	44.39	44.31
θ_3	θ_3^*	1	1	1.0001	0.99924	0.02036	0.02054	24.85	24.76
θ_4	θ_4^*	1	1	0.99975	1.0008	0.02586	0.02557	19.55	19.67
θ_5	θ_5^*	1	1	0.98301	1.0004	0.01017	0.01027	49.65	49.63
θ_6	θ_6^*	1	4	1.004	4.0008	0.1179	0.1203	4.306	<i>16.93</i>
θ_7	θ_7^*	1	4	0.98823	3.9929	0.1362	0.01409	3.67	<i>144</i>

Reference $t_{\text{value}} 95\%$ 1.6558

Si può concludere che, nonostante con un campionamento continuo la stima possa essere effettuata anche per il caso base, il caso riparametrizzato migliora di molto la precisione della stima degli ultimi due parametri.

Tabella 3.12 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$)). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1	0.391	0.848	-0.887	0.645	-0.544	0.531
s_2	0.391	1	0.814	-0.762	0.5	-0.408	0.402
s_3	0.848	0.814	1	-0.995	0.694	-0.63	0.62
s_4	-0.887	-0.762	-0.995	1	-0.707	0.647	-0.635
s_5	0.645	0.5	0.694	-0.707	1	-0.451	0.442
s_6	-0.544	-0.408	-0.63	0.647	-0.451	1	-0.999
s_7	0.531	0.402	0.62	-0.635	0.442	-0.999	1

Tabella 3.13 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (caso riparametrizzato). Si evidenziano in corsivo i termini che hanno subito un netto miglioramento tramite il metodo di riparametrizzazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1	0.399	0.852	-0.889	0.646	-0.528	0.0747
s_2	0.399	1	0.814	-0.765	0.503	-0.404	0.165
s_3	0.852	0.814	1	-0.995	0.694	-0.617	0.216
s_4	-0.889	-0.765	-0.995	1	-0.707	0.633	-0.202
s_5	0.646	0.503	0.694	-0.707	1	-0.442	0.119
s_6	-0.528	-0.404	-0.617	0.633	-0.442	1	-0.792
s_7	0.0747	0.165	0.216	-0.202	0.119	-0.792	1

Esaminando invece le Tabelle 3.12 e 3.13, risulta evidente che la riparametrizzazione permette di ottenere il forte effetto anticorrellante desiderato.

3.2.1.2 Caso discreto

Dopo aver confermato la validità del metodo per il caso con tre esperimenti in parallelo con campionamento continuo, si passa alla valutazione del vettore $\boldsymbol{\varphi}$ ottimale per ognuno dei tre esperimenti condotti contemporaneamente nel caso di un campionamento discreto.

In pratica viene scelto, per ognuno dei tre esperimenti, il vettore $\boldsymbol{\varphi}$ (in questo caso si assume che esso comprenda unicamente i tempi di campionamento) in grado di massimizzare la traccia della matrice di informazione \mathbf{H}_{θ^*} . A questo punto si procede con il confronto fra la stima parametrica del caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$) e quella del caso riparametrizzato.

Si ricorda che, dal momento che l'approccio proposto è quello *offline*, la matrice di riparametrizzazione \mathbf{A} risulta uguale a quella descritta dalla formula (3.8).

In entrambi i casi si è imposto un valore di $\omega = 0.02$ sul modello dell'errore di misura e si fissa il vincolo di 9 campionamenti per esperimento.

Il valore iniziale della stima parametrica $\hat{\boldsymbol{\theta}}^*$ è imposto uguale al valore vero normalizzato di $\boldsymbol{\theta}^*$, in maniera da valutare l'efficacia del metodo a prescindere dall'incertezza iniziale sulla stima parametrica.

I risultati, riportati nelle Tabelle 3.14, 3.15, 3.16, dimostrano che il metodo di riparametrizzazione porta a un sensibile aumento della precisione della stima parametrica; le considerazioni fatte per l'esperimento con campionamento continuo si riflettono anche in questo caso, dimostrando come la scelta di stimare i parametri θ_6^* e θ_7^* , al posto dei parametri θ_6 e θ_7 molto correlati, porti a una maggiore facilità nello stimare l'intero set parametrico.

Tabella 3.14 Confronto fra le stime parametriche ottenute nel caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$) e quelle ottenute nel caso riparametrizzato (3 esperimenti in parallelo con campionamento discreto). Si evidenziano in grassetto i valori di $t_{\text{value}}^{95\%}$ inferiori al valore di riferimento; si evidenziano in corsivo i termini che hanno subito un netto miglioramento tramite il metodo di riparametrizzazione. Per la stima di θ a partire dal set θ^* ottenuto, tramite il metodo che sarà descritto nel paragrafo 4.1.1, si rimanda alla Tabella A3.1

Parametro		Valore vero normalizzato		Stima		St.deviation		$t_{\text{value}}^{95\%}$	
base	rip	base	rip	base	rip	base	rip	base	rip
θ_1	θ_1^*	1	1	1.0118	1.0122	0.1099	0.1103	4.414	4.398
θ_2	θ_2^*	1	1	0.97933	0.97984	0.03939	0.03953	11.92	11.88
θ_3	θ_3^*	1	1	0.98823	0.98917	0.1169	0.1173	4.052	4.055
θ_4	θ_4^*	1	1	1.0081	1.0072	0.1458	0.146	3.313	3.308
θ_5	θ_5^*	1	1	1.0374	1.034	0.04846	0.04841	10.26	10.24
θ_6	θ_6^*	1	4	0.99504	3.9821	0.651	<i>0.6409</i>	0.7327	2.979
θ_7	θ_7^*	1	4	1.01	4.0045	0.8186	<i>0.1712</i>	0.5915	<i>11.21</i>

Reference $t_{\text{value}}^{95\%}$ 1.7251

Tabella 3.15 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti, caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$)). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1	0.928	0.978	-0.982	0.848	-0.682	0.668
s_2	0.928	1	0.979	-0.975	0.794	-0.81	0.801
s_3	0.978	0.979	1	-0.999	0.841	-0.803	0.792
s_4	-0.982	-0.975	-0.999	1	-0.848	0.793	-0.782
s_5	0.848	0.794	0.841	-0.848	1	-0.647	0.636
s_6	-0.682	-0.81	-0.803	0.793	-0.647	1	-0.999
s_7	0.668	0.801	0.792	-0.782	0.636	-0.999	1

Tabella 3.16 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti, caso riparametrizzato). Si evidenziano in corsivo i termini che hanno subito un netto miglioramento tramite il metodo di riparametrizzazione. In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1	0.928	0.978	-0.982	0.849	<i>-0.667</i>	<i>0.514</i>
s_2	0.928	1	0.979	-0.975	0.795	<i>-0.801</i>	<i>0.681</i>
s_3	0.978	0.979	1	-0.999	0.842	<i>-0.791</i>	<i>0.663</i>
s_4	-0.982	-0.975	-0.999	1	-0.849	<i>0.781</i>	<i>-0.645</i>
s_5	0.849	0.795	0.842	-0.849	1	<i>-0.638</i>	<i>0.51</i>
s_6	<i>-0.667</i>	<i>-0.801</i>	<i>-0.791</i>	<i>0.781</i>	<i>-0.638</i>	1	<i>-0.97</i>
s_7	<i>0.514</i>	<i>0.681</i>	<i>0.663</i>	<i>-0.645</i>	<i>0.51</i>	<i>-0.97</i>	1

3.2.3 Influenza dell'errore relativo alla stima parametrica iniziale sulla riparametrizzazione della progettazione

Dopo aver appurato la validità del metodo di riparametrizzazione della progettazione per il miglioramento della precisione della stima parametrica nel caso ideale in cui il valore vero dei parametri sia noto, è opportuno valutare se il metodo risulta altrettanto efficace nel caso reale, in cui la stima iniziale sui parametri è incerta.

Si assume che il valore iniziale dei parametri di progetto (normalizzati) e della relativa incertezza iniziale sulla stima siano pari a quelli riportati in Tabella 3.17.

Tabella 3.17 Valore dei parametri di progetto normalizzati e relativa incertezza

	θ_1	θ_2	θ_3	θ_4	θ_5	θ_6	θ_7
Valore vero normalizzato	1	1	1	1	1	1	1
Valore di progetto normalizzato	0.8333	1.1333	0.8333	1.1333	1.1333	1.1333	0.8333
Min	0.3333	0.6333	0.3333	0.6333	0.6333	0.6333	0.3333
Max	1.3333	1.6333	1.3333	1.6333	1.6333	1.6333	1.3333

A questo punto, analogamente a quanto fatto in precedenza, si effettua la simulazione stocastica di tre esperimenti in parallelo con campionamento continuo rispettivamente alle concentrazioni $C_{a,1} = 0.1$ mg/L, $C_{a,2} = 1$ mg/L, $C_{a,3} = 2$ mg/L, e si sceglie come matrice \mathbf{A} quella in grado di massimizzare la somma dei determinanti delle tre matrici di informazione \mathbf{H}_{θ^*} .

Anche in questo caso, dato il valore estremamente basso del determinante, si calcola il prodotto dei primi 5 autovalori della matrice di informazione \mathbf{H}_{θ^*} per ognuno dei tre esperimenti e in seguito si valuta la somma di questi tre valori come funzione obiettivo.

In questo caso si ottiene la seguente matrice \mathbf{A} di riparametrizzazione:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3.9)$$

Fatto questo si passa all'ottimizzazione, per ogni esperimento, del vettore $\boldsymbol{\varphi}$ (anche in questo caso si assume che esso comprenda unicamente i tempi di campionamento) in grado di massimizzare la traccia della matrice di informazione \mathbf{H}_{θ^*} .

A questo punto si procede con il confronto fra la stima parametrica del caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$) e quella del caso riparametrizzato.

In entrambi i casi si impone un valore di $\omega = 0.02$ sul modello dell'errore di misura e si fissa il vincolo di 9 campionamenti per esperimento; il valore iniziale della stima parametrica $\hat{\theta}^*$ è imposto uguale al valore di progetto normalizzato di θ^* .

I risultati, riportati nelle Tabelle 3.18, 3.19, 3.20, dimostrano che il metodo di riparametrizzazione porta a un sensibile aumento della precisione della stima parametrica: rimane comunque da comprendere se l'aumento della precisione relativa alla stima permette di ottenere effettivamente anche l'accuratezza desiderata.

Tabella 3.18 Confronto fra le stime parametriche ottenute nel caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$) e quelle ottenute nel caso riparametrizzato in presenza di incertezza iniziale sui parametri (3 esperimenti in parallelo con campionamento discreto). Si evidenziano in grassetto i valori di $t_{\text{value}95\%}$ inferiori al valore di riferimento. Per la stima di θ a partire dal set θ^* ottenuto, tramite il metodo che sarà descritto nel paragrafo 4.1.1, si rimanda alla Tabella A3.2

Parametro		Valore vero normalizzato		Stima		St.deviation		$t_{\text{value}95\%}$	
base	rip	base	rip	base	rip	base	Rip	base	rip
θ_1	θ_1^*	1	1	0.93358	0.89467	0.06523	0.04963	6.861	8.642
θ_2	θ_2^*	1	1	0.94983	0.96509	0.03075	0.02673	14.81	17.31
θ_3	θ_3^*	1	1	0.90125	0.88828	0.08368	0.07367	5.163	5.78
θ_4	θ_4^*	1	1	1.1442	1.1826	0.1475	0.1446	3.719	3.92
θ_5	θ_5^*	1	1	0.97889	0.97241	0.03325	0.03374	14.11	13.81
θ_6	θ_6^*	1	4	1.1715	3.7812	0.8504	0.1061	0.6604	17.08
θ_7	θ_7^*	1	5	0.82944	4.8297	0.7036	0.6965	0.5651	3.324
Reference $t_{\text{value}95\%}$								1.7251	

Tabella 3.19 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti, caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$)) in presenza di incertezza iniziale sui parametri. In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1	0.809	0.971	-0.979	0.816	-0.88	0.882
s_2	0.809	1	0.922	-0.905	0.713	-0.815	0.817
s_3	0.971	0.922	1	-0.998	0.814	-0.916	0.917
s_4	-0.979	-0.905	-0.998	1	-0.823	0.917	-0.918
s_5	0.816	0.713	0.814	-0.823	1	-0.732	0.732
s_6	-0.88	-0.815	-0.916	0.917	-0.732	1	-1
s_7	0.882	0.817	0.917	-0.918	0.732	-1	1

Tabella 3.20 *Matrice di correlazione fra i parametri stimati (3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti, caso riparametrizzato) in presenza di incertezza iniziale sui parametri. Si evidenziano in corsivo i termini che hanno subito un netto miglioramento tramite il metodo di riparametrizzazione*

	s₁	s₂	s₃	s₄	s₅	s₆	s₇
s₁	1	0.893	0.98	-0.984	0.757	0.985	0.874
s₂	0.893	1	0.961	-0.951	0.666	0.914	0.879
s₃	0.98	0.961	1	-0.998	0.739	-0.978	0.922
s₄	-0.984	-0.951	-0.998	1	-0.753	-0.974	-0.92
s₅	0.757	0.666	0.739	-0.753	1	-0.733	0.653
s₆	0.985	0.914	-0.978	-0.974	-0.733	1	<i>0.847</i>
s₇	0.874	0.879	0.922	-0.92	0.653	<i>0.847</i>	1

Capitolo 4

Influenza dell'errore di misura sulla progettazione ottimale degli esperimenti

Le considerazioni effettuate fino a questo punto riguardano la possibilità di stimare i parametri del modello di Tam *et al.* (2005) con il nuovo metodo di riparametrizzazione della progettazione, simulando esperimenti *in silico* con un errore di misura molto basso (in particolare, $\omega = 0.02$). Tale assunzione condiziona fortemente il risultato e si pone come caso ideale non replicabile nella realtà; pertanto si è proceduto alla valutazione dell'efficacia del metodo proposto nel caso in cui sia presente maggior rumore sulle variabili misurate ($\omega = 0.07$).

4.1 Relazione tra l'aumento dell'errore di misura e la stima parametrica

Analogamente a quanto svolto nel paragrafo 3.2.1, si effettua la progettazione di tre esperimenti in parallelo scegliendo, per ognuno dei tre esperimenti, il vettore ϕ (che in questa prima stima comprende solo i tempi di campionamento) in grado di massimizzare la traccia della matrice di informazione \mathbf{H}_{θ^*} . A questo punto si confronta la stima ottenuta nel caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$) con quella ottenuta nel caso riparametrizzato. Per il caso riparametrizzato lo scenario ottimale risulta quello per il quale si ottiene la matrice \mathbf{A} :

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (4.1)$$

In entrambi i casi si impone un valore di $\omega = 0.07$ sul modello dell'errore di misura e si fissa il vincolo di 9 campionamenti per esperimento.

I risultati, riportati nelle Tabelle 4.1, 4.2, 4.3, dimostrano che l'introduzione di un errore di misura maggiore pregiudica l'identificabilità dei parametri anche nel caso in cui si utilizzi il metodo di riparametrizzazione degli esperimenti proposto in questo lavoro di Tesi.

Nonostante questo si può comunque osservare come l'utilizzo del metodo di riparametrizzazione migliori la stima, in particolare per quanto concerne i parametri θ_6^* e θ_7^* rispetto ai parametri θ_6 e θ_7 ; la correlazione tra i due parametri θ_6^* e θ_7^* risulta infatti inferiore rispetto a quella relativa ai parametri θ_6 e θ_7 , come si può osservare confrontando le Tabelle 4.1 e 4.2.

Tabella 4.1 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti, caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$)), in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.835	0.976	-0.982	0.83	-0.891	0.893
s_2	0.835	1.0000	0.931	-0.918	0.737	-0.83	0.831
s_3	0.976	0.931	1.0000	-0.998	0.828	-0.92	0.922
s_4	-0.982	-0.918	-0.998	1.0000	-0.836	-0.923	-0.925
s_5	0.83	0.737	0.828	-0.836	1.0000	-0.756	0.757
s_6	-0.891	-0.83	-0.92	-0.923	-0.756	1.0000	-1
s_7	0.893	0.831	0.922	-0.925	0.757	-1	1.0000

Tabella 4.2 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti, caso riparametrizzato, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione; si evidenziano in corsivo i termini che hanno subito un netto miglioramento tramite il metodo di riparametrizzazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.905	0.984	-0.987	0.681	0.983	0.875
s_2	0.905	1.0000	0.962	-0.954	0.551	0.941	0.885
s_3	0.984	0.962	1.0000	-0.998	0.643	0.995	0.921
s_4	-0.987	-0.954	-0.998	1.0000	-0.664	-0.991	-0.916
s_5	0.681	0.551	0.643	-0.664	1.0000	0.635	0.538
s_6	0.983	0.941	0.995	-0.991	0.635	1.0000	<i>0.935</i>
s_7	0.875	0.885	0.921	-0.916	0.538	<i>0.935</i>	1.0000

Tuttavia il valore di $t_{\text{value}95\%}$ minore rispetto a quello di riferimento per i parametri θ_3^* , θ_4^* e θ_7^* (vedi Tabella 4.3) suggerisce di affrontare comunque un ulteriore ciclo di esperimenti, in quanto i dati a disposizione non risultano sufficienti per ottenere una stima statisticamente affidabile; d'altra parte, come osservato anche nel capitolo precedente, il metodo, finalizzato nel caso particolare unicamente all'individuazione di due parametri alternativi ai fini della

progettazione, tende a spostare la correlazione su altri parametri, con il rischio che la stima rimanga comunque difficoltosa.

Tabella 4.3 Confronto fra le stime parametriche ottenute nel caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$) e quelle ottenute nel caso riparametrizzato (3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno). Si evidenziano in grassetto i valori di $t_{\text{value}}95\%$ inferiori al valore di riferimento; si evidenziano in corsivo i termini che hanno subito un significativo miglioramento tramite il metodo di riparametrizzazione. Per la stima di θ a partire dal set θ^* ottenuto, tramite il metodo che sarà descritto nel paragrafo 4.1.1, si rimanda alla Tabella A3.3

Parametro		Valore vero normalizzato		Stima		St.deviation		$t_{\text{value}} 95\%$	
base	rip	base	rip	base	rip	base	rip	base	rip
θ_1	θ_1^*	1	1	0.94671	0.91366	0.2548	0.1941	1.781	2.257
θ_2	θ_2^*	1	1	0.93649	0.95673	0.1118	0.09095	4.016	5.043
θ_3	θ_3^*	1	1	0.90434	0.89151	0.3105	0.2674	1.396	1.598
θ_4	θ_4^*	1	1	1.1216	1.1814	0.5202	0.5109	1.034	1.109
θ_5	θ_5^*	1	1	1.0772	0.98253	0.1331	0.1414	3.879	3.332
θ_6	θ_6^*	1	4	1.1905	3.8048	3.008	0.5822	0.1897	<i>3.133</i>
θ_7	θ_7^*	1	5	0.8266	4.8808	2.439	2.477	0.1624	<i>0.9447</i>

Reference $t_{\text{value}} 95\%$ 1.7251

Prima di affrontare il secondo set di tre esperimenti in parallelo e commentare i risultati ottenuti confrontando caso base e caso riparametrizzato, è opportuno soffermarsi su un aspetto che non è stato ancora affrontato, ma che risulta indispensabile per un confronto preciso tra i due casi; finora, infatti, si è tenuto in considerazione unicamente il valor medio e la deviazione standard ottenuti rispettivamente per il set θ del caso base e il set θ^* del caso riparametrizzato; per attuare una valutazione effettiva della validità del metodo di riprogettazione è invece opportuno ricavare il set di parametri θ a partire dal set θ^* stimato nel caso riparametrizzato e stabilire la varianza su θ a partire da quella, conosciuta, su θ^* .

4.1.1 Determinazione della varianza del set parametrico θ

Nel momento in cui si effettua la stima parametrica sul nuovo set θ^* , oltre a procedere con la valutazione del valor medio θ tramite la relazione $\theta = \mathbf{A}^{-1} \cdot \theta^*$, risulta opportuno calcolare la varianza/deviazione standard relativa al set θ , in maniera da quantificare l'incertezza sul valore dei parametri ottenuti con il metodo di riprogettazione e confrontarla con quella ottenuta attraverso una progettazione standard.

In questo lavoro di Tesi ogni parametro del set θ^* è stato generato come somma di un generico numero di parametri del set θ : supponendo, ad esempio, che $\theta_1^* = \theta_1 + \theta_2 + \theta_3$, è possibile applicare la relazione:

$$V(\theta_1^*) = V\left(\sum_{i=1}^3 \theta_i\right) = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \text{Cov}(\theta_i, \theta_j) = \sum_{i=1}^3 V(\theta_i) + \sum_{\substack{i=1, \\ i \neq j}}^3 \text{Cov}(\theta_i, \theta_j) \quad (4.2)$$

da cui, esplicitando l'espressione in funzione di θ_1 , si ottiene:

$$V(\theta_1) = V(\theta_1^*) - \sum_{i=2}^3 V(\theta_i) - \sum_{\substack{i=1, \\ i \neq j}}^3 \text{Cov}(\theta_i, \theta_j) \quad (4.3)$$

Osservando la relazione ottenuta appare evidente che il calcolo della varianza sui parametri θ a partire dalla varianza sul set θ^* non può essere effettuato analiticamente senza avere conoscenza del valore della matrice di varianza-covarianza relativa al set θ ; dal momento che quest'ultima non è nota a priori, si è scelto di valutare la varianza su θ attraverso un metodo alternativo.

Si è utilizzata la function `mvnrnd(MU, SIGMA)` fornita dal software Matlab[®] per simulare una distribuzione normale multivariata con MU pari al vettore dei valori di θ^* stimati utilizzando `gPROMS`[®] e $SIGMA$ coincidente con la matrice Σ_{θ^*} di varianza-covarianza sulla stima parametrica.

E' da precisare che $SIGMA$ deve essere una matrice semidefinita positiva per poter essere utilizzata nella funzione `mvnrnd(MU, SIGMA)`; nel caso in questione e, in generale, in qualsiasi caso in cui la matrice di informazione presenti un determinante vicino allo zero, questo può non accadere: la procedura di ottimizzazione tramite massimizzazione di un'opportuna metrica della matrice H_{θ^*} può infatti portare alla realizzazione di stime parametriche per cui la matrice di varianza-covarianza parametrica non risulti semidefinita positiva.

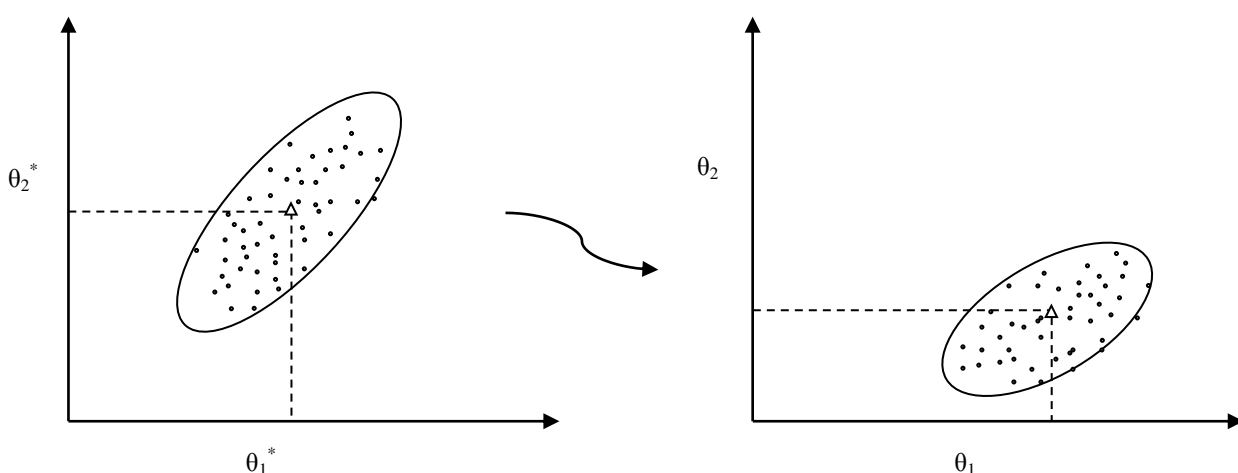


Figura 4.1 Rappresentazione grafica della procedura adottata per il calcolo del valore del set parametrico θ e della varianza sul valore stimato; il disegno evidenzia come il passaggio da un set parametrico all'altro possa comportare una sensibile variazione della distribuzione dell'errore rispetto al valore atteso dei parametri. Oltre a questo è possibile che anche il valor medio del set θ ottenuto con Matlab[®] differisca dal valore ottenuto applicando la (2.22) nel caso in cui la reale distribuzione dell'errore non segua l'andamento gaussiano.

Per ovviare al problema sopra descritto sono stati valutati gli autovalori della matrice di varianza e covarianza e si è modificato l'autovalore con il modulo minore (in quanto negativo a causa di errori numerici derivati dall'ottimizzazione su gPROMS[®]); questo artificio non pregiudica la corrispondenza con la matrice di partenza, alterando gli elementi in maniera minima o nulla.

A questo punto si costruiscono n scenari generati attraverso la distribuzione `mvnrnd` e si calcola per ognuno di questi il valore dei parametri θ tramite la relazione $\theta = \mathbf{A}^{-1} \cdot \theta^*$. In questo modo ottengo una nuova distribuzione di n elementi θ di cui posso calcolare il valor medio e la varianza rispettivamente tramite i comandi `mean` e `var` presenti in Matlab[®].

4.2 Risultati ottenuti simulando serie di esperimenti in parallelo

Ottenuta la prima stima, riportata in Tabella 4.3, si è deciso di progettare un secondo ciclo di tre esperimenti in parallelo sia per il caso senza riparametrizzazione sia per quello riparametrizzato, partendo dalla conoscenza ottenuta sui parametri dopo il primo set di esperimenti e ottimizzando sia la concentrazione di antibiotico C_a , sia la collocazione ottimale dei punti di campionamento.

Dal momento che l'entità *Optimisation* presente in gPROMS[®] non consente l'ottimizzazione simultanea delle due grandezze sopra citate, si è proceduto con un'ottimizzazione in due step: inizialmente si è deciso di individuare le tre concentrazioni che massimizzano il determinante della matrice di informazione; in un secondo momento si è scelto di stimare la collocazione ottimale dei 9 tempi di campionamento attraverso la massimizzazione della traccia della matrice di informazione di ogni esperimento, come spiegato nel capitolo 3.

Prima di passare all'analisi dei risultati è opportuno soffermarsi sulle difficoltà riscontrate nella fase di ottimizzazione delle concentrazioni C_a tramite gPROMS[®]. Essa risulta infatti lenta dal punto di vista computazionale e fortemente dipendente dai vincoli e dalle condizioni iniziali imposte dall'utente; d'altro canto bisogna precisare che, in assenza di vincoli, il software tende a dare come risposta tre concentrazioni ottimali che danno origine a profili con ricrescita della coltura batterica, aspetto che rende difficile la stima di quei parametri che influenzano maggiormente i profili di sola crescita o morte del ceppo batterico.

4.2.1 Caso non riparametrizzato

Per il caso non riparametrizzato, partendo dalla prima stima parametrica ottenuta, si è ottenuto il set delle nuove concentrazioni ottimali pari a $C_a = [0.21, 1.25, 1.85]$ mg/L; dopo aver ottimizzato anche i tempi di campionamento si è proceduto alla simulazione *in silico* dei tre esperimenti, fissando nuovamente $\omega = 0.07$.

I risultati di questa seconda stima sono riportati nelle Tabelle 4.4 e 4.5; come si può notare la stima parametrica è poco precisa, in particolare per quanto riguarda i parametri θ_6 e θ_7 , che risultano ancora una volta i parametri più difficili da stimare sia in termini di accuratezza, sia in termini di precisione.

Tabella 4.4 Stime parametriche ottenute per 3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, caso non riparametrizzato in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$); si evidenziano in grassetto i valori di $t_{\text{value}95\%}$ inferiori al valore di riferimento

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.deviation	$t_{\text{value}95\%}$
θ_1	1	1.0177	0.08287	6.105
θ_2	1	0.91035	0.05207	8.692
θ_3	1	0.92249	0.09473	4.841
θ_4	1	1.1041	0.1408	3.898
θ_5	1	1.0336	0.06769	7.591
θ_6	1	1.2228	0.6709	0.9061
θ_7	1	0.81423	0.511	0.7921
Reference $t_{\text{value}95\%}$				1.6787

Tabella 4.5 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, caso non riparametrizzato in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione.

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.6	0.886	-0.894	0.588	0.172	-0.174
s_2	0.6	1.0000	0.896	-0.876	0.503	-0.123	0.122
s_3	0.886	0.896	1.0000	-0.994	0.619	-0.0394	0.0403
s_4	-0.894	-0.876	-0.994	1.0000	-0.634	0.0832	-0.0806
s_5	0.588	0.503	0.619	-0.634	1.0000	-0.0973	0.0961
s_6	0.172	-0.123	-0.0394	0.0832	-0.0973	1.0000	-0.999
s_7	-0.174	0.122	0.0403	-0.0806	0.0961	-0.999	1.0000

4.2.2 Caso riparametrizzato (caso 0)

Utilizzando l'approccio *offline* definito nel capitolo 2 si è ottimizzata la progettazione del secondo set di esperimenti partendo dalla prima stima parametrica ottenuta con il metodo riparametrizzato. Si è mantenuta la matrice \mathbf{A} definita dalla (4.1) anche per il secondo set di esperimenti; dall'ottimizzazione si è ottenuto il set delle nuove concentrazioni ottimali, pari a $C_a = [0.87, 1.27, 2]$ mg/L; dopo aver ottimizzato anche i tempi di campionamento si è proceduto alla simulazione *in silico* dei tre esperimenti, fissando nuovamente $\omega = 0.07$.

I risultati di questa seconda stima sono riportati nelle Tabelle 4.6 e 4.7: come si può notare la stima parametrica è precisa per tutti e sette i parametri θ^* ; per confrontare i risultati ottenuti in questo caso con quelli relativi al caso non riparametrizzato è però necessario, come spiegato nel sottoparagrafo 4.1.1, ricondursi al set parametrico θ .

Tabella 4.6 Stime parametriche ottenute per il set θ^* nel caso riparametrizzato (caso 0, 3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)).

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.deviation	t_{value} 95%
θ_1^*	1	1.0808	0.1217	4.416
θ_2^*	1	1.0091	0.045	11.15
θ_3^*	1	1.06	0.1005	5.243
θ_4^*	1	0.9446	0.1043	4.504
θ_5^*	1	1.0938	0.1068	5.09
θ_6^*	4	4.2372	0.4285	4.916
θ_7^*	5	4.811	0.4322	5.533
Reference t_{value} 95%				1.6787

Tabella 4.7 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (caso 0, 3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione; si evidenziano in corsivo i termini che hanno subito un netto miglioramento tramite il metodo di riparametrizzazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.489	0.92	-0.926	0.58	0.702	0.0126
s_2	0.489	1.0000	0.787	-0.764	0.355	0.357	0.172
s_3	0.92	0.787	1.0000	-0.993	0.575	0.621	0.135
s_4	-0.926	-0.764	-0.993	1.0000	-0.599	-0.583	-0.174
s_5	0.58	0.355	0.575	-0.599	1.0000	0.3	0.169
s_6	0.702	0.357	0.621	-0.583	0.3	1.0000	-0.678
s_7	0.0126	0.172	0.135	-0.174	0.169	-0.678	1.0000

I risultati relativi al set θ sono riportati nella Tabella 4.8; è evidente che non vi sono miglioramenti sensibili rispetto al caso non riparametrizzato (Tabella 4.4); l'accuratezza dei primi cinque parametri risulta notevolmente migliorata, ma il valor medio stimato per gli ultimi due parametri è peggiore rispetto a quello ottenuto nel caso non riparametrizzato. Per quanto riguarda la precisione della stima non si nota un miglioramento netto: probabilmente questo è dovuto al fatto che la matrice \mathbf{A} di riparametrizzazione porta a uno spostamento di correlazione che non elimina la difficoltà di stima.

Tabella 4.8 Stime parametriche ottenute per il set θ nel caso riparametrizzato (caso 0, 3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)).

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.deviation
θ_1	1	1.0808	0.1171
θ_2	1	1.0091	0.0459
θ_3	1	1.06	0.1001
θ_4	1	0.9446	0.1030
θ_5	1	1.0938	0.1022
θ_6	1	1.3799	0.7296
θ_7	1	0.7165	0.4237

Per far fronte a questo problema si è dunque pensato di ridefinire la matrice \mathbf{A} basandosi sulla matrice di correlazione riportata in Tabella 4.7 e cercando di ridurre anche la correlazione tra i parametri θ_3 e θ_4 , pari a -0.993.

4.2.3 Casi riparametrizzati con riadattamento della matrice \mathbf{A}

In questo sottoparagrafo si riportano le due stime maggiormente significative ottenute durante il lavoro di Tesi; per ricavare ciascuna di queste sono stati adottati due criteri differenti; nel primo caso (Caso 1) si è costruita \mathbf{A} intervenendo sui parametri maggiormente correlati nel caso base, nel secondo caso (Caso 2) si è individuata una matrice in grado di generare un set parametrico poco correlato.

4.2.3.1 Caso 1

Dal momento che dopo l'applicazione della matrice di riparametrizzazione si è ottenuta una correlazione elevata per i parametri θ_3 e θ_4 , si è provato a simulare un set di 3 + 3 esperimenti costruendo una nuova matrice di riparametrizzazione \mathbf{A} con una struttura come quella riportata nell'espressione (4.4)

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ a_{3,1} & a_{3,2} & 1 & a_{3,2} & a_{3,5} & a_{3,6} & a_{3,7} \\ a_{4,1} & a_{4,2} & a_{4,3} & 1 & a_{4,5} & a_{4,6} & a_{4,7} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ a_{6,1} & a_{6,2} & a_{6,3} & a_{6,4} & a_{6,5} & 1 & a_{6,7} \\ a_{7,1} & a_{7,2} & a_{7,3} & a_{7,4} & a_{7,5} & a_{7,6} & 1 \end{bmatrix} \quad (4.4)$$

Considerato che i parametri θ_3 e θ_4 risultano altamente correlati in caso di applicazione della matrice di riparametrizzazione definita in (4.1), si è pensato di riprogettare l'esperimento variando anche questi due parametri; scelta la matrice \mathbf{A} con il metodo di ottimizzazione spiegato nel sottoparagrafo 3.2.1.1, si è quindi proceduto alla progettazione di due set da tre esperimenti in parallelo, ottimizzando i valori delle concentrazioni di antibiotico e dei tempi di campionamento e fissando nuovamente un errore di misura pari a $\omega = 0.07$.

Nel caso in questione la matrice \mathbf{A} ottimale è risultata quella sotto riportata:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (4.5)$$

La stima parametrica e la matrice di correlazione ottenute per questo caso sono riportate nelle Tabelle 4.9 e 4.10: come si può notare la stima parametrica è precisa per tutti e sette i parametri θ^* ; in Tabella 4.11 si riportano invece i valori ottenuti per il set parametrico θ con i rispettivi valori di deviazione standard. Si può notare che la stima ottenuta per i parametri θ_6 e θ_7 risulta più accurata rispetto al caso base e al caso riparametrizzato (caso 0), nonostante la precisione rimanga scarsa. Rispetto al caso riparametrizzato (caso 0) si ha una leggera diminuzione di accuratezza e di precisione sulla stima dei restanti cinque parametri: questo è probabilmente dovuto al fatto che la scelta della nuova matrice \mathbf{A} sposta la correlazione su altri parametri, non riuscendo a risolvere in maniera definitiva il problema di identificabilità.

Tabella 4.9 Stime parametriche ottenute per il set θ^* (caso 1, 3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)).

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.deviation	t _{value} 95%
θ_1^*	1	1.1191	0.1498	3.714
θ_2^*	1	0.96768	0.03106	15.49
θ_3^*	3	3.101	0.6123	2.518
θ_4^*	4	4.1842	0.1746	11.91
θ_5^*	1	1.0735	0.05599	9.531
θ_6^*	4	4.1553	0.2782	7.425
θ_7^*	2	2.039	0.1922	5.274

Reference t_{value} 95% 1.6787

Tabella 4.10 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (caso 1, 3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione; si evidenziano in corsivo i termini che hanno subito un netto miglioramento tramite il metodo di riparametrizzazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.434	0.35	0.956	0.393	0.681	0.343
s_2	0.434	1.0000	0.262	0.403	0.126	0.451	0.254
s_3	0.35	0.262	1.0000	0.332	0.204	0.891	0.992
s_4	0.956	0.403	0.332	1.0000	0.639	0.698	0.321
s_5	0.393	0.126	0.204	0.639	1.0000	0.481	0.201
s_6	0.681	0.451	0.891	0.698	0.481	1.0000	0.894
s_7	0.343	0.254	0.992	0.321	0.201	0.894	1.0000

Tabella 4.11 Stime parametriche ottenute per il set θ (caso 1, 3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)).

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.deviation
θ_1	1	1.1191	0.1506
θ_2	1	0.96768	0.0319
θ_3	1	1.0428	0.1080
θ_4	1	0.9488	0.1131
θ_5	1	1.0735	0.0589
θ_6	1	0.9296	0.4153
θ_7	1	1.1094	0.5982

4.2.3.2 Caso 2

A questo punto sono state effettuate numerose prove, variando attraverso una procedura *trial and error* la struttura di \mathbf{A} : in particolare si evidenzia il caso per cui la matrice di riparametrizzazione \mathbf{A} assume la forma:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ a_{3,1} & a_{3,2} & 1 & a_{3,2} & a_{3,5} & a_{3,6} & a_{3,7} \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ a_{5,1} & a_{5,2} & a_{5,3} & a_{5,4} & 1 & a_{5,6} & a_{5,7} \\ a_{6,1} & a_{6,2} & a_{6,3} & a_{6,4} & a_{6,5} & 1 & a_{6,7} \\ a_{7,1} & a_{7,2} & a_{7,3} & a_{7,4} & a_{7,5} & a_{7,6} & 1 \end{bmatrix} \quad (4.6)$$

Anche in questo caso la matrice \mathbf{A} è stata scelta attraverso il metodo di ottimizzazione spiegato nel sottoparagrafo 3.2.1.1; si è poi proceduto alla progettazione dei due set di tre esperimenti in parallelo, ottimizzando i valori delle concentrazioni di antibiotico e dei tempi di campionamento e fissando nuovamente un errore di misura pari a $\omega = 0.07$.

Nel caso in questione la matrice \mathbf{A} ottimale è risultata quella sotto riportata:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (4.7)$$

Notiamo innanzitutto come la matrice di correlazione parametrica ottenuta per questo caso, riportata in Tabella 4.12, risulti notevolmente migliore rispetto a tutti i casi esaminati finora; questo dimostra ancora una volta che un'adeguata riparametrizzazione dell'esperimento può influire notevolmente sulla stimabilità dei parametri, dal momento che ricostruisce la matrice di informazione su nuovi parametri scelti dall'utente. Se si prende in considerazione la capacità del metodo di riparametrizzazione di migliorare la descrizione del profilo temporale di concentrazione dell'antibiotico rispetto al caso base, i miglioramenti non sono elevati: già con le stime ottenute nel caso base si ottiene una buona descrizione delle curve time-kill, come si può osservare in Figura 4.2.

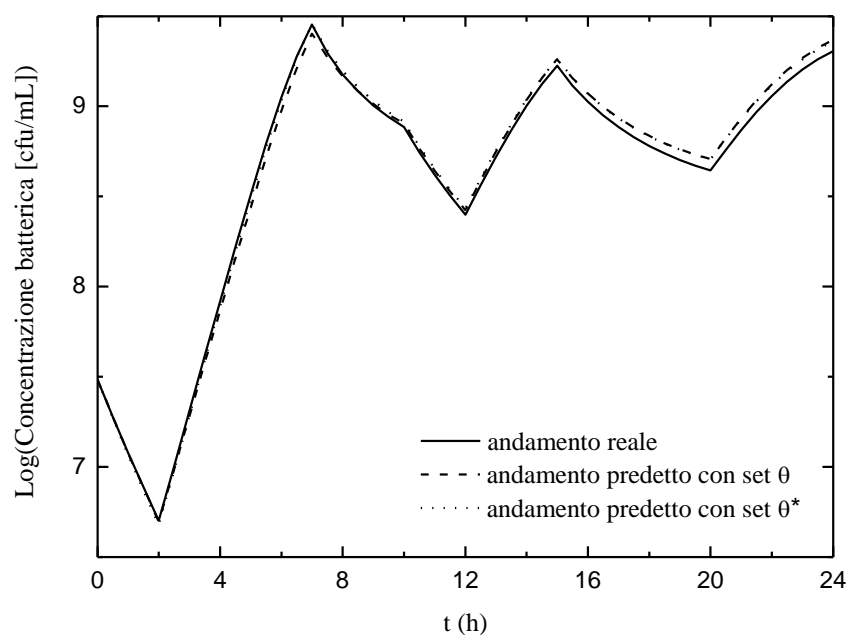


Figura 4.2 Confronto tra i profili di concentrazione ottenuti nel caso reale, non riparametrizzato e riparametrizzato

Comunque sia si può notare come fino a 12 h il profilo ottenuto con la riparametrizzazione dell'esperimento sia maggiormente simile a quello reale; se si valuta l'integrale dell'errore sui valori di concentrazione di microrganismo ottenuti inserendo nel modello le stime ottenute con e senza riparametrizzazione, si ottiene un integrale dell'errore pari a 0.96 per il caso non riparametrizzato e un valore pari a 0.85 per il caso riparametrizzato, segno di un leggero miglioramento anche in questo senso.

Il risultato maggiormente significativo consiste nella capacità del potenziale utente di modificare i parametri su cui basare la progettazione al fine di guadagnare maggiore informazione sul valore reale dei parametri del modello.

Se si esaminano le Tabelle 4.13 e 4.14 si può notare infatti che, nonostante la precisione sui parametri θ_6 e θ_7 risulti bassa (ma in generale migliore rispetto al caso base), l'accuratezza migliora notevolmente, avvicinandosi al valore reale dei parametri.

Tabella 4.12 *Matrice di correlazione fra i parametri stimati (caso 2, 3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)). Si evidenziano in corsivo i termini che hanno subito un netto miglioramento tramite il metodo di riparametrizzazione*

	S₁	S₂	S₃	S₄	S₅	S₆	S₇
S₁	1.0000	0.637	0.628	-0.921	-0.392	-0.156	0.0617
S₂	0.637	1.0000	0.443	-0.871	-0.214	-0.375	0.213
S₃	0.628	0.443	1.0000	<i>-0.616</i>	0.462	-0.23	0.202
S₄	-0.921	-0.871	<i>-0.616</i>	1.0000	0.335	0.378	-0.224
S₅	-0.392	-0.214	0.462	0.335	1.0000	0.00872	0.0346
S₆	-0.156	-0.375	-0.23	0.378	0.00872	1.0000	-0.82
S₇	0.0617	0.213	0.202	-0.224	0.0346	-0.82	1.0000

Tabella 4.13 *Stime parametriche ottenute per il set θ^* (caso 2, 3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)).*

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.deviation	t_{value} 95%
θ_1^*	1	1.0319	0.1072	4.783
θ_2^*	1	1.0079	0.05727	8.749
θ_3^*	3	3.1162	0.07205	21.5
θ_4^*	1	0.97556	0.1319	3.677
θ_5^*	3	3.0896	0.05954	25.79
θ_6^*	3	3.0672	0.5034	3.029
θ_7^*	2	2.047	0.05549	18.34

Reference t_{value} 95% 1.6787

Tabella 4.14 Stime parametriche ottenute per il set θ (caso 2, 3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)).

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.deviation
θ_1	1	1.0319	0.1075
θ_2	1	1.0079	0.0579
θ_3	1	1.0345	0.1156
θ_4	1	0.97556	0.1326
θ_5	1	1.10614	0.0853
θ_6	1	1.05974	0.4735
θ_7	1	0.98726	0.5205

4.2.4 Conclusioni

La conclusione che emerge da queste ultime simulazioni è che il raggiungimento di una buona precisione sul set parametrico θ del modello di Tam *et al.* (2005) risulta difficile nel caso in cui sia presente un elevato errore di misura, a causa del basso valore del determinante della matrice di informazione in fase di design; tuttavia l'applicazione di una riparametrizzazione della progettazione degli esperimenti può portare a un notevole miglioramento della stima parametrica, in particolare in termini di accuratezza, nel caso in cui il nuovo set parametrico venga scelto in maniera da minimizzare le componenti della matrice di varianza-covarianza sui parametri; questa proprietà della matrice, come visto nel caso 2, è verificata a posteriori a seguito della stima parametrica, non potendo essere utilizzata come criterio di progettazione; il passo successivo potrebbe consistere nell'individuare un metodo per progettare la matrice \mathbf{A} in grado di mantenere basse correlazioni parametriche, in maniera da evitare il meccanismo di scelta *trial and error* utilizzato, il quale si è dimostrato dispendioso dal punto di vista del tempo utilizzato.

In sintesi il metodo proposto e studiato in questo lavoro di Tesi è a uno stadio preliminare e necessita di studi ulteriori, in particolare per quanto concerne alcuni fattori quali:

- adozione della struttura opportuna della matrice \mathbf{A} di riparametrizzazione in funzione dei parametri del modello;
- scelta di un approccio ottimale per la selezione della matrice \mathbf{A} di riparametrizzazione;
- automatizzazione della procedura di riparametrizzazione della progettazione di esperimenti.

Nonostante questo, esso può potenzialmente configurarsi come un mezzo efficace per identificare modelli caratterizzati da parametri correlati, non identificabili con tecniche standard di progettazione sperimentale.

Conclusioni

L'applicazione di tecniche di MBDoE a modelli con elevata correlazione parametrica evidenzia alcuni limiti strutturali, principalmente legati all'identificabilità dei modelli stessi, che rendono difficile il raggiungimento di stime accurate e precise. Prendendo in considerazione il modello farmacodinamico di Tam *et al.* (2005a) ed effettuando diverse progettazioni secondo tecniche MBDoE in parallelo in maniera da massimizzare l'informazione al fine di stimare i parametri del modello, si è riscontrata l'impossibilità di stimare con sufficiente accuratezza e precisione i parametri maggiormente correlati fra loro.

Questo problema ha portato all'ideazione di un metodo di riparametrizzazione della progettazione degli esperimenti, il quale si configura come possibile alternativa alla progettazione tradizionale con lo scopo di rendere possibile la realizzazione del design sperimentale anche con modelli difficilmente identificabili.

L'applicazione di questo metodo ha portato alla progettazione di esperimenti in grado di fornire una stima parametrica più accurata e precisa rispetto alla procedura classica, nonostante i risultati ottenuti dimostrino che non sia possibile eliminare in maniera definitiva il problema dell'alta incertezza sulla stima dei parametri maggiormente correlati fra loro. Quest'ultimo aspetto è di difficile interpretazione in quanto può essere dovuto a numerosi fattori quali il numero limitato di configurazioni della matrice di riparametrizzazione testate, il rumore sulle misure effettuate, il limitato numero di variabili manipolabili del modello considerato.

Bisogna però ricordare che il metodo è a uno stadio preliminare e che la sue potenzialità sono notevoli, in quanto permettono di ovviare al problema di identificabilità attraverso la creazione di una matrice di informazione creata ad hoc dall'utente. Gli sviluppi futuri di questo lavoro possono quindi evolvere verso l'approfondimento dello studio sulla validità del metodo, estendendone l'utilizzo anche ad altri modelli per comprendere se i limiti riscontrati in questo lavoro di Tesi siano dovuti unicamente alla struttura intrinseca del modello studiato. Vi è poi da comprendere come automatizzare la scelta della matrice di riparametrizzazione ottimale in funzione del modello da identificare e della correlazione presente tra i parametri, nonché testare l'approccio ottimale per la selezione di tale matrice.

Nomenclatura

Simboli generici

AUC	=	area under curve ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$)
$C(t)$	=	concentrazione batterica ($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)
$C_{50,k}$	=	concentrazione di farmaco per cui la velocità di morte risulta dimezzata [modello di Tam. <i>et al.</i> (2005)] ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
$C_a(t)$	=	concentrazione di antibiotico ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
c_{ij}	=	correlazione tra la colonna i -esima e j -esima di $\mathbf{P_E}$
CL	=	clearance ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)
C_p	=	concentrazione plasmatica del farmaco (mg/L)
E	=	effetto misurato (\cdot)
$E[\cdot]$	=	valore atteso (\cdot)
EC_{50}	=	concentrazione a cui si ha metà dell'effetto massimo E (mg/L)
F	=	biodisponibilità (-)
$G(t)$	=	termine di crescita naturale della coltura batterica in vitro ($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
H	=	esponente di sigmoidicità [modello di Tam. <i>et al.</i> (2005)] (-)
$K(t)$	=	termine di decadimento della coltura batterica in vitro ($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
k_{ij}	=	costante di velocità di trasferimento dal compartimento i al compartimento j
K_g	=	velocità di crescita massima [modello di Tam. <i>et al.</i> (2005)] (h^{-1})
K_k	=	velocità di morte massima [modello di Tam. <i>et al.</i> (2005)] (h^{-1})
$L_r(\boldsymbol{\theta})$	=	funzione di massima verosimiglianza
MBC	=	<i>minimum bactericidal concentration</i> (mg/L)
MIC	=	<i>minimum inhibitory concentration</i> (mg/L)
$N(t)$	=	concentrazione batterica in vitro ($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)
N_{exp}	=	numero di esperimenti effettuati in parallelo (-)
N_M	=	numero di risposte stimate dal modello (-)
N_{MAX}	=	carica batterica massima [modello di Tam. <i>et al.</i> (2005)] ($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)
N_s	=	numero delle variabili di stato (-)
N_{sp}	=	numero di campionamenti (-)
N_u	=	numero delle variabili manipolabili dinamiche (-)
N_y	=	numero delle uscite del modello (-)
N_w	=	numero delle variabili manipolabili costanti (-)
N_θ	=	numero dei parametri del modello (-)
N_φ	=	numero delle componenti del vettore dell'esperimento(-)
s^2	=	stima della varianza sulle misure
t	=	tempo (h)

$t_{1/2}$	=	tempo di emivita (h)
t_i	=	valore del t_{value} relativo al parametro i -esimo
V_d	=	volume di distribuzione (L)
X	=	quantità di farmaco presente nell'organismo (mg)

Simboli greci

α	=	parametro del modello a varianza lineare
β	=	parametro del modello a varianza lineare
β	=	adattamento massimo [modello di Tam. <i>et al.</i> (2005)] (-)
γ	=	costante eteroschedastica (-)
λ_i	=	autovalore i -esimo
μ_i	=	valor medio degli elementi dell' i -esima colonna di \mathbf{P}_E
ν	=	gradi di libertà
$\psi(\cdot)$	=	generica metrica relativa a una matrice (\cdot)
σ_y	=	deviazione standard sulla risposta y
σ_θ	=	deviazione standard sul parametro θ
$\tilde{\sigma}_{rs}$	=	componente r,s -esima dell'inversa della matrice Σ_y di varianza-covarianza sulle misure sperimentali
τ	=	durata dell'esperimento (h)
τ	=	fattore di velocità d'adattamento [modello di Tam. <i>et al.</i> (2005)] ($L \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$)
ω	=	parametro di deviazione standard sulle misure

Matrici

\mathbf{A}	=	matrice di riparametrizzazione
$\mathbf{H}_\theta(\boldsymbol{\theta}, \boldsymbol{\varphi})$	=	matrice di informazione di Fisher
$\mathbf{H}_{\theta^*}(\boldsymbol{\theta}, \boldsymbol{\varphi})$	=	matrice di informazione di Fisher calcolata rispetto ai parametri ottenuti con la riparametrizzazione
\mathbf{H}_θ^0	=	matrice di informazione di Fisher iniziale
$\mathbf{M}(\boldsymbol{\theta})$	=	modello nello spazio degli stati (<i>state-space model</i>) (\cdot)
\mathbf{P}_E	=	matrice di stimabilità ($N_{\text{sp}} \times N_M, N_\theta$)
\mathbf{Q}_r	=	matrice di sensitività dinamica relativa alla risposta r -esima ($N_{\text{sp}} \times N_\theta$)
$\mathbf{S}_y(t_k)$	=	matrice di sensitività delle uscite del modello all'istante t_k ($N_M \times N_\theta$)
\mathbf{t}_{sp}	=	vettore dei tempi di campionamento ($N_{\text{sp}} \times 1$)
$\mathbf{u}(t)$	=	vettore delle variabili manipolabili dinamiche ($N_u \times 1$)
$\mathbf{V}(\boldsymbol{\theta}, \boldsymbol{\varphi})$	=	matrice di varianza-covarianza parametrica
$\mathbf{x}(t)$	=	vettore delle variabili di stato ($N_s \times 1$)
$\dot{\mathbf{x}}(t)$	=	vettore delle derivate temporali delle variabili di stato ($N_s \times 1$)
$\mathbf{y}(t)$	=	vettore delle uscite del modello ($N_y \times 1$)

\mathbf{y}_0	=	vettore delle condizioni iniziali sulle variabili misurate ($N_y \times 1$)
$\hat{\mathbf{y}}(t)$	=	vettore delle risposte stimate del modello ($N_M \times 1$)
\mathbf{w}	=	vettore delle variabili manipolabili costanti nel tempo ($N_w \times 1$)
$\boldsymbol{\varphi}$	=	vettore dell'esperimento ($N_\varphi \times 1$)
$\boldsymbol{\Sigma}_y$	=	matrice di varianza-covarianza sulle misure sperimentali ($N_M \times N_M$)
$\boldsymbol{\Sigma}_\theta$	=	approssimazione della matrice di varianza-covarianza sui parametri ($N_\theta \times N_\theta$)
$\boldsymbol{\eta}(t)$	=	vettore del rumore e dell'errore sistematico sulle variabili misurate ($N_M \times 1$)
$\boldsymbol{\theta}$	=	vettore dei parametri del modello ($N_\theta \times 1$)
$\hat{\boldsymbol{\theta}}$	=	vettore delle stime parametriche ottenute sui parametri del modello ($N_\theta \times 1$)
$\boldsymbol{\theta}_0$	=	vettore della stima iniziale dei parametri ($N_\theta \times 1$)
$\boldsymbol{\theta}^*$	=	vettore del set di parametri ottenuti con la riparametrizzazione ($N_\theta \times 1$)

Acronimi

CFU	=	unità formanti colonie (<i>colonies forming units</i>)
DAE	=	equazioni algebrico-differenziali (<i>differential algebraic equations</i>)
DoE	=	progettazione ottimale di esperimenti (<i>optimal design of experiments</i>)
LS	=	metodo dei minimi quadrati (<i>least squares</i>)
MBDoe	=	progettazione ottimale di esperimenti basata sul modello (<i>model-based design of experiments</i>)
MHB	=	brodo Mueller-Hinton (<i>Mueller-Hinton broth</i>)
MINLP	=	<i>Mixed Integer Nonlinear Programming</i>
ML	=	metodo di massima verosimiglianza (<i>maximum likelihood</i>)
NAPG	=	<i>non parametric adaptative grid</i>
PAE	=	effetto post-antibiotico (<i>post-antibiotic effect</i>)
PD	=	farmacodinamica (<i>pharmacodynamics</i>)
PK	=	farmacocinetica (<i>pharmacokinetics</i>)
SSWR	=	somma dei quadrati dei residui pesati (<i>sum of squares of weighted residuals</i>)

Appendice 1

Tecniche di riparametrizzazione effettuate su un singolo esperimento

Come primo tentativo di riparametrizzazione del modello (vedi capitolo 3) si è pensato di ideare una matrice \mathbf{A} invertibile con componenti diagonali unitarie e componenti extradiagonali pari a 0 o a 1; in pratica il nuovo set parametrico si può esprimere come:

$$\theta_i^* = \sum_{j=1}^7 a_{ij} \cdot \theta_j \quad , \text{ per } i = 1, \dots, 7 \quad (\text{A1.1})$$

dove a_{ij} è la componente ij -esima della matrice \mathbf{A} .

La condizione di invertibilità su \mathbf{A} è necessaria in quanto, una volta stimati i parametri θ^* , per avere un stima relativa al set di partenza è necessario effettuare l'operazione: $\theta = \mathbf{A}^{-1} \cdot \theta^*$.

Per comprendere l'effettiva validità del metodo di riparametrizzazione si è effettuata una prova preliminare simulando tre singoli esperimenti a C_a pari rispettivamente a 0.1, 1 e 2 mg/L.

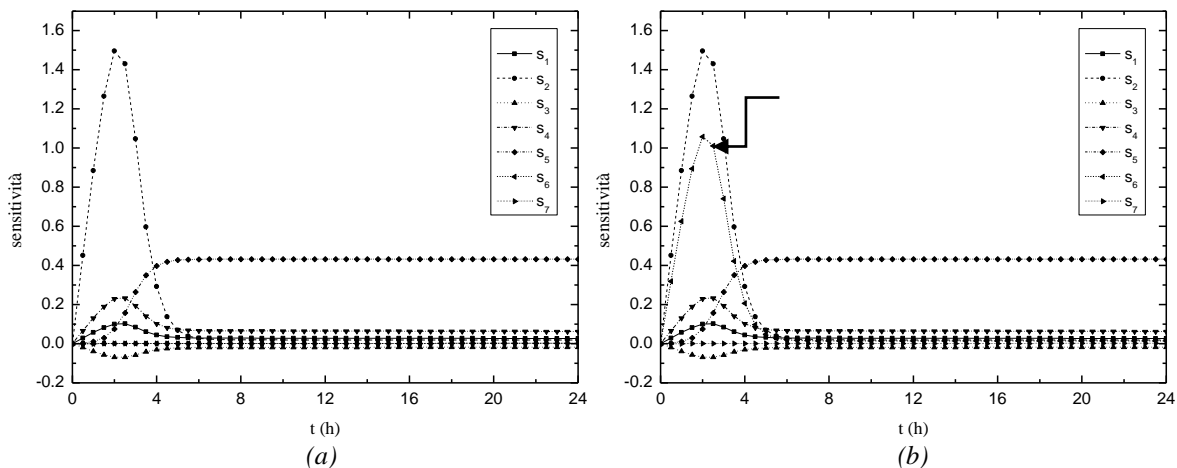


Figura A1.1 Profilo sensitività per $C_a = 0.1$ mg/L: (a) caso base , (b) caso riparametrizzato

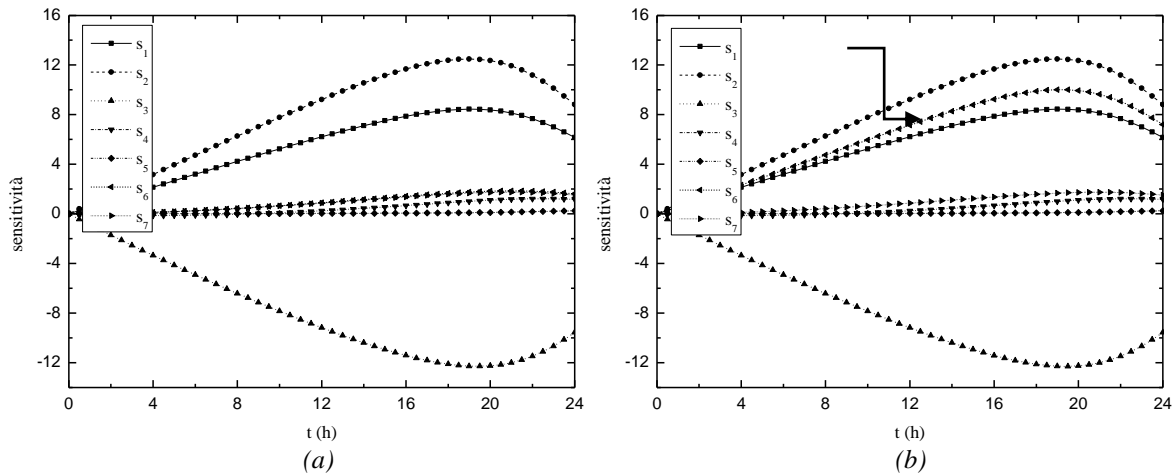


Figura A1.2 Profilo sensitività per $C_a = 1$ mg/L: (a) caso base , (b) caso riparametrizzato

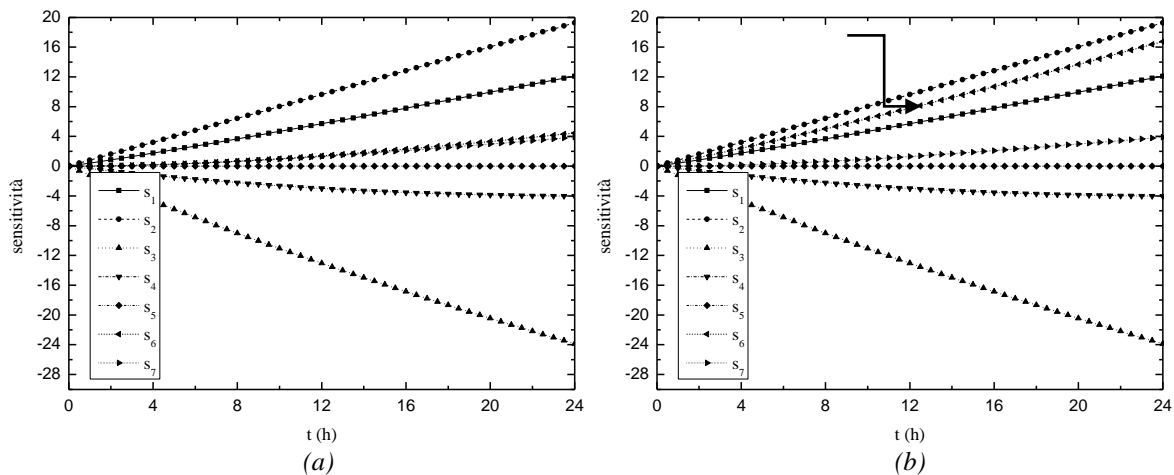


Figura A1.3 Profilo sensitività per $C_a = 2$ mg/L: (a) caso base , (b) caso riparametrizzato

Confrontando i profili di sensitività ottenuti rispetto al set parametrico del modello ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$, caso base) e quelli calcolati rispetto a un nuovo set ottenuto tramite una matrice \mathbf{A} , in cui l'unica componente extradiagonale non nulla è $\mathbf{A}(6,2)$ si può notare come il profilo di sensitività rispetto al nuovo parametro $\theta_6^* = \theta_2$ e θ_6 risulti sensibilmente differente rispetto al caso base (Figure A1.1, A1.2, A1.3); ciò porta a pensare che, tramite l'individuazione di un'opportuna matrice \mathbf{A} ottimale, la difficoltà di stima dei parametri $\boldsymbol{\theta}$ possa trovare soluzione spostando il problema sulla stima di un opportuno set $\boldsymbol{\theta}^*$ meno correlato.

In seguito, essendo il problema di identificabilità prettamente legato ai parametri θ_6 e θ_7 , si è optato per una costruzione di \mathbf{A} come quella rappresentata dall'espressione (A1.2); essa prevede unicamente la variazione degli ultimi due parametri, lasciando inalterati i primi cinque, in quanto già facilmente stimabili secondo Ballan (2011).

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ a_{6,1} & a_{6,2} & a_{6,3} & a_{6,4} & a_{6,5} & 1 & a_{6,7} \\ a_{7,1} & a_{7,2} & a_{7,3} & a_{7,4} & a_{7,5} & a_{7,6} & 1 \end{bmatrix} \quad (\text{A1.2})$$

A1.1 Implementazione di una simulazione stocastica per l'individuazione della matrice di riparametrizzazione ottimale

Lo scopo della simulazione stocastica è quello di individuare l'eventuale matrice \mathbf{A} invertibile in grado di generare un determinante della matrice di informazione integrale maggiore rispetto al caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$); in quest'ultimo caso, infatti, il determinante della matrice di informazione assume un valore tendente a zero, indice del fatto che l'identificabilità dei parametri non è garantita.

Si generano le componenti della matrice \mathbf{A} di ogni scenario tramite una distribuzione random di valori interi pari a 0 o a 1; in particolare si utilizza la funzione $\text{INT}(\text{UNIFORM}(0, 2))$ di gPROMS[®].

Si effettua una prima valutazione della bontà del metodo proposto simulando $n = 100$ scenari per le seguenti C_a e assumendo un campionamento continuo:

- Caso 1: $C_a = 0.1$ mg/L;
- Caso 2: $C_a = 1$ mg/L;
- Caso 3: $C_a = 2$ mg/L.

Per ogni caso simulato si è attuato un confronto tra il determinante della matrice di informazione integrale ottenuto nel caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$) alla concentrazione C_a scelta e gli n determinanti calcolati in ogni scenario. Nelle Figure A1.4a, A1.5a e A1.6a si riportano i grafici ottenuti per ognuno dei casi sopra citati.

Dato il valore estremamente basso del determinante, il quale rende difficile la discriminazione tra casi diversi, si procede con una scelta della matrice \mathbf{A} ottimale basata sulla ricerca del massimo prodotto tra i 5 autovalori di \mathbf{H}_{θ^*} maggiori in valore assoluto.

E' necessario infine introdurre un controllo a posteriori per garantire l'invertibilità di \mathbf{A} ; per fare questo si utilizza il software Matlab[®], dal momento che in gPROMS[®] non è presente la funzione che permette il calcolo della matrice inversa.

Caso 1

La simulazione stocastica effettuata per questo caso porta alla luce il fatto che esiste uno scenario, il numero 97, per cui la funzione obiettivo (specificata in Figura A1.4a) risulta massimizzata. Questo suggerisce che la matrice \mathbf{A} presente nello scenario 97 possa generare una matrice di informazione \mathbf{H}_{θ^*} più distante dalla singolarità rispetto a quella iniziale. In Figura A1.4b si può notare come i profili di sensitività rispetto al set parametrico proposto in questo scenario presentino andamenti maggiormente diversificati, indice di una minore correlazione tra i nuovi parametri.

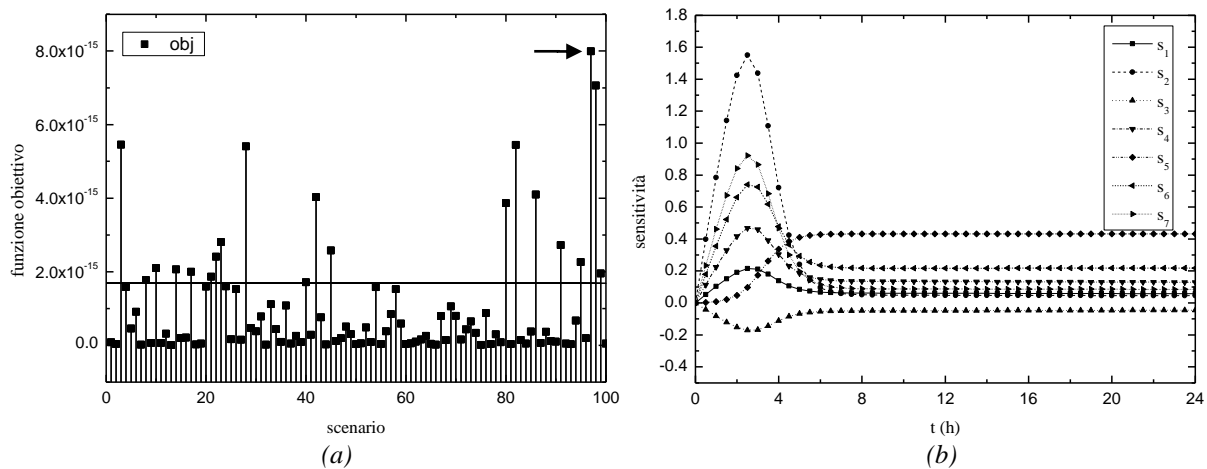


Figura A1.4 Simulazione stocastica a $C_a = 0.1\text{mg/L}$: (a) funzione obiettivo $= \prod_1^5 \lambda_i$: la freccia nera indica lo scenario ottimale, la linea continua parallela all'asse delle ascisse evidenzia il valore della funzione obiettivo per il caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$), (b) profilo di sensitività per lo scenario ottimale

Questo si può notare anche confrontando i valori delle componenti della matrice di correlazione tra le colonne delle matrici di stimabilità \mathbf{P}_E (Tabella 3.6 e Tabella A1.1). In particolare si nota che questo metodo porta alla diminuzione della correlazione tra i parametri θ_6 e θ_7 (evidenziata nella Tabella A1.1), nonostante l'aumento del valore di altre componenti rispetto al caso base evidenzia lo spostamento della correlazione su altri parametri.

Tabella A1.1 Matrice di correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E (caso riparametrizzato; $C_a = 0.1 \text{ mg/L}$). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7
S_1	1.0000	0.9620	-1.0000	0.9999	-0.5325	0.9993	0.9753
S_2	0.9620	1.0000	-0.9620	0.9620	-0.7425	0.9573	0.9985
S_3	-1.0000	-0.9620	1.0000	-0.9999	0.5325	-0.9992	-0.9752
S_4	0.9999	0.9620	-0.9999	1.0000	-0.5279	0.9996	0.9743
S_5	-0.5325	-0.7425	0.5325	-0.5279	1.0000	-0.5171	-0.7051
S_6	0.9993	0.9573	-0.9992	0.9996	-0.5171	1.0000	0.9715
S_7	0.9753	0.9985	-0.9752	0.9743	-0.7051	0.9715	1.0000

Caso 2

La simulazione stocastica effettuata per questo caso porta alla luce il fatto che lo scenario numero 23 è quello che fornisce la funzione obiettivo massima (specificata in Figura A1.5a).

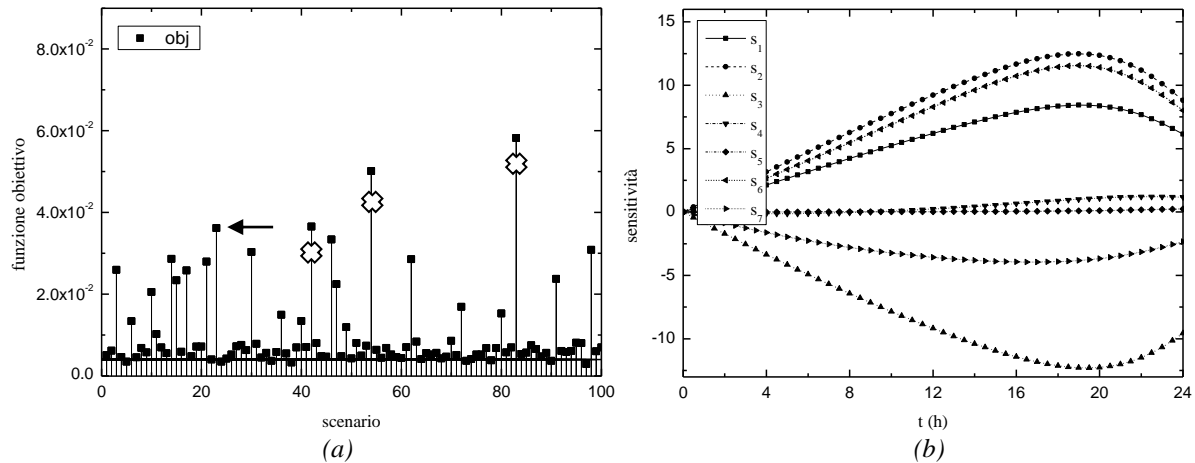


Figura A1.5 Simulazione stocastica a $C_a = 1 \text{ mg/L}$: (a) funzione obiettivo $= \prod_1^5 \lambda_i$: la freccia nera indica lo scenario ottimale, la linea continua parallela all'asse delle ascisse evidenzia il valore della funzione obiettivo per il caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$), le croci bianche indicano gli scenari esclusi a causa della non invertibilità della matrice \mathbf{A} generata, (b) profilo di sensibilità per lo scenario ottimale

Anche per questo caso si riportano in Figura A1.5b i nuovi profili di sensibilità ottenuti; in Tabella A1.2 si riportano, analogamente al Caso 1, i valori delle componenti della matrice di correlazione tra le colonne delle matrici di stimabilità \mathbf{P}_E .

Tabella A1.2 Matrice di correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E (caso riparametrizzato; $C_a = 1 \text{ mg/L}$). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.9997	-0.9991	0.8152	0.5744	0.9994	-0.9293
s_2	0.9997	1.0000	-0.9981	0.8042	0.5559	0.9996	-0.9355
s_3	-0.9991	-0.9981	1.0000	-0.8239	-0.5998	-0.9973	0.9242
s_4	0.8152	0.8042	-0.8239	1.0000	0.8884	0.8149	-0.5452
s_5	0.5744	0.5559	-0.5998	0.8884	1.0000	0.5620	-0.2828
s_6	0.9994	0.9996	-0.9973	0.8149	0.5620	1.0000	-0.9273
s_7	-0.9293	-0.9355	0.9242	-0.5452	-0.2828	-0.9273	1.0000

In questo caso il metodo porta a una diminuzione ancora più netta della correlazione tra i parametri θ_6 e θ_7 ; l'aumento elevato del valore di altre componenti rispetto al caso base lascia ancora il dubbio che il problema della stima permanga e suggerisce pertanto una stima dei parametri per comprendere la veridicità di questa considerazione.

Caso 3

Per la simulazione stocastica effettuata per questo caso, lo scenario numero 21 è quello che fornisce la funzione obiettivo massima (specificata in Figura A1.6a).

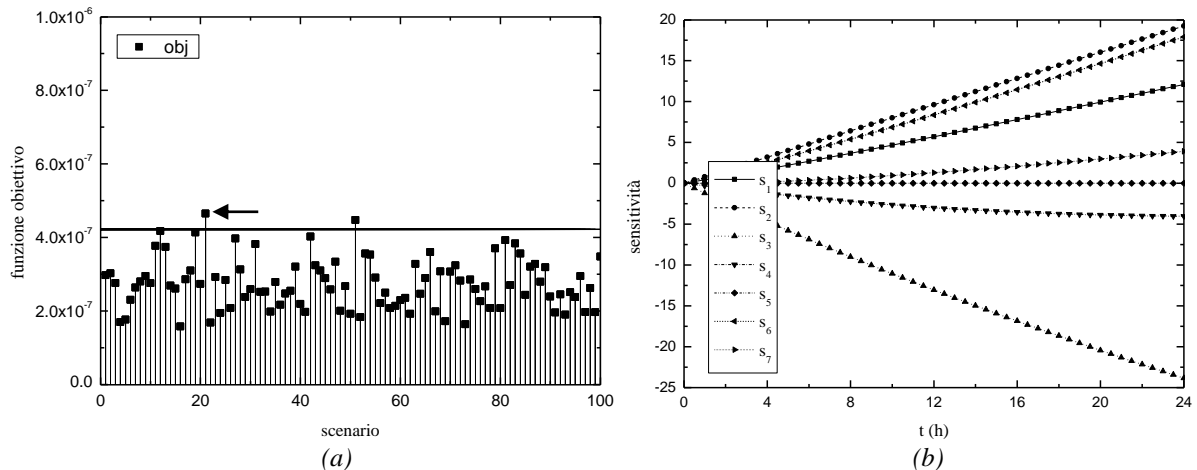


Figura A1.6 Simulazione stocastica a $C_a = 2$ mg/L: (a) funzione obiettivo $= \prod_{i=1}^5 \lambda_i$: la freccia nera indica lo scenario ottimale, la linea continua parallela all'asse delle ascisse evidenzia il valore della funzione obiettivo per il caso base ($\mathbf{A} = \mathbf{I}$), (b) profilo di sensitività per lo scenario ottimale

Anche in questo caso il metodo porta a una diminuzione della correlazione tra i parametri θ_6 e θ_7 (evidenziata nella Tabella A1.3), aumentando tuttavia la correlazione tra altri parametri che nel caso base risultavano meno correlati.

Tabella A1.3 Matrice di correlazione tra le colonne di \mathbf{P}_E (caso riparametrizzato; $C_a = 2$ mg/L). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.9996	-0.9968	-0.9584	0.5038	1.0000	0.9907
s_2	0.9996	1.0000	-0.9987	-0.9663	0.5235	0.9994	0.9862
s_3	-0.9968	-0.9987	1.0000	0.9781	-0.5521	-0.9964	-0.9766
s_4	-0.9584	-0.9663	0.9781	1.0000	-0.6480	-0.9570	-0.9109
s_5	0.5038	0.5235	-0.5521	-0.6480	1.0000	0.5019	0.4115
s_6	1.0000	0.9994	0.9964	-0.9570	0.5019	1.0000	0.9913
s_7	0.9907	0.9862	-0.9766	-0.9109	0.4115	0.9913	1.0000

Dopo aver effettuato i test di identificabilità si procede alla realizzazione di un singolo esperimento in silico con campionamento continuo (per ognuno dei casi sopra descritti) e alla successiva stima parametrica, imponendo un valore di deviazione standard ω sulle misure pari a 0.02. Il valore iniziale della stima parametrica $\hat{\theta}^*$ è imposto uguale al valore vero normalizzato di θ^* , in maniera da valutare l'efficacia del metodo a prescindere dall'incertezza

iniziale sulla stima parametrica; i risultati ottenuti sono quelli riportati nelle Tabelle A1.4, A1.5, A1.6.

Osservando i risultati proposti appare evidente che un unico esperimento non porta all'acquisizione di informazioni sufficienti per poter stimare con precisione il valore del nuovo set parametrico θ^* i valori di $t_{\text{value}95\%}$ risultano infatti inferiori di diversi ordini di grandezza rispetto al valore di riferimento, indicando la necessità di un maggior numero di campionamenti per migliorare la precisione delle stime. Si può concludere pertanto che il metodo di riparametrizzazione della progettazione, pur diminuendo la correlazione tra i parametri θ_6 e θ_7 , non riesce a risolvere il problema della stima parametrica nel caso in cui venga effettuato un singolo esperimento.

Tabella A1.4 Stime parametriche finali (caso riparametrizzato, campionamento continuo, $C_a = 0.1$ mg/L). Si evidenziano in grassetto i valori di $t_{\text{value}95\%}$ inferiori al valore di riferimento

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.Deviation	$t_{\text{value}95\%}$
θ_1^*	1	1.013	$3.118 \cdot 10^6$	$1.612 \cdot 10^{-7}$
θ_2^*	1	1.0017	$7.239 \cdot 10^4$	$6.866 \cdot 10^{-6}$
θ_3^*	1	1.0061	$8.972 \cdot 10^5$	$5.564 \cdot 10^{-7}$
θ_4^*	1	1.0075	$1.654 \cdot 10^6$	$3.023 \cdot 10^{-7}$
θ_5^*	1	1.0014	$7.911 \cdot 10^4$	$6.281 \cdot 10^{-6}$
θ_6^*	4	3.5	/	/
θ_7^*	5	4.5	/	/
Reference $t_{\text{value}95\%}$				1.6821

Tabella A1.5 Stime parametriche finali (caso riparametrizzato, campionamento continuo, $C_a = 1$ mg/L). Si evidenziano in grassetto i valori di $t_{\text{value}95\%}$ inferiori al valore di riferimento

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.Deviation	$t_{\text{value}95\%}$
θ_1^*	1	1.0027	$1.834 \cdot 10^4$	$2.709 \cdot 10^{-5}$
θ_2^*	1	0.99946	$1.107 \cdot 10^4$	$4.474 \cdot 10^{-5}$
θ_3^*	1	0.99976	811.8	0.0006102
θ_4^*	1	1.0029	4210	0.000118
θ_5^*	1	1.0373	$1.263 \cdot 10^4$	$4.071 \cdot 10^{-5}$
θ_6^*	4	4.0077	$4.097 \cdot 10^4$	$4.847 \cdot 10^{-5}$
θ_7^*	4	3.9853	1111	0.001778
Reference $t_{\text{value}95\%}$				1.6821

Tabella A1.6 Stime parametriche finali (caso riparametrizzato, campionamento continuo, $C_a = 2$ mg/L). Si evidenziano in grassetto i valori di $t_{\text{value}95\%}$ inferiori al valore di riferimento

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.Deviation	$t_{\text{value}95\%}$
θ_1^*	1	1.0004	2522	0.0001965
θ_2^*	1	1.0004	1421	0.0003489
θ_3^*	1	0.99971	257.2	0.001926
θ_4^*	1	0.99859	594.9	0.0008318
θ_5^*	1	1.0019	1350	0.0003677
θ_6^*	4	3.9981	669.8	0.002958
θ_7^*	1	0.99805	1258	0.000393
Reference $t_{\text{value}95\%}$				1.6821

Appendice 2

Riparametrizzazione basata su parametri ottenuti dal prodotto dei parametri del modello

Dal momento che il problema di identificabilità per il modello di Tam *et al.* (2005a) risulta prettamente legato ai parametri θ_6 e θ_7 , si è mantenuta una costruzione della matrice di riparametrizzazione \mathbf{A} come quella rappresentata dall'espressione (A2.1); essa prevede unicamente la variazione degli ultimi due parametri, lasciando inalterati i primi cinque, in quanto già facilmente stimabili secondo Ballan (2011).

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ a_{6,1} & a_{6,2} & a_{6,3} & a_{6,4} & a_{6,5} & 1 & a_{6,7} \\ a_{7,1} & a_{7,2} & a_{7,3} & a_{7,4} & a_{7,5} & a_{7,6} & 1 \end{bmatrix} \quad (\text{A2.1})$$

A questo punto sono stati simulati $n = 100$ scenari in ciascuno dei quali vengono effettuati tre esperimenti in parallelo con campionamento continuo ($C_{a,1} = 0.1$ mg/L, $C_{a,2} = 1$ mg/L, $C_{a,3} = 2$ mg/L).

Si generano le componenti della matrice \mathbf{A} di ogni scenario tramite una distribuzione random di valori interi pari a 0 o a 1; in particolare si utilizza la funzione $\text{INT}(\text{UNIFORM}(0, 2))$ di gPROMS®; fatto questo, le componenti di ogni riga i della matrice \mathbf{A} vengono utilizzate come indicatori dei parametri da considerare come fattori che generano il nuovo parametro θ_i^* .

Per esempio, qualora la matrice \mathbf{A} assumesse la struttura:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (\text{A2.2})$$

il nuovo set parametrico diventerebbe:

$$\boldsymbol{\theta}^* = [\theta_1, \theta_2, \theta_3, \theta_4, \theta_5, \theta_1 \cdot \theta_2 \cdot \theta_5 \cdot \theta_6, \theta_3 \cdot \theta_4 \cdot \theta_7] \quad (\text{A2.3})$$

Al termine della simulazione si seleziona la matrice \mathbf{A} in grado di massimizzare la somma dei determinanti delle tre matrici di informazione \mathbf{H}_{θ^*} . La matrice \mathbf{A} ottenuta dall'ottimizzazione risulta:

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (\text{A2.4})$$

Utilizzando l'approccio *offline* definito nel capitolo 2 si è ottimizzata la progettazione di due set da tre esperimenti ciascuno, mantenendo la matrice \mathbf{A} definita dalla (4) anche per il secondo set di esperimenti; dopo la prima stima parametrica si è ottenuto il set delle nuove concentrazioni ottimali, pari a $C_a = [1, 1.2, 1.9]$ mg/L, e dei tempi di campionamento, sempre a partire dal set di parametri generato da \mathbf{A} . Si è imposto un valore di $\omega = 0.07$ sul modello dell'errore di misura e si è fissato il vincolo di 9 campionamenti per esperimento. In Tabella A2.1 è riportata la stima ottenuta per il set $\boldsymbol{\theta}^*$, in Tabella A2.2 la matrice di correlazione tra i parametri, la quale evidenzia la difficoltà del metodo presentato in questa Appendice di eliminare la correlazione esistente tra gli ultimi due parametri. In Tabella A2.3 si riporta infine il valore della stima ottenuta per il set $\boldsymbol{\theta}$ tramite il metodo illustrato nel paragrafo 4.2. La stima ottenuta risulta più precisa, ma meno accurata rispetto a quella ottenuta generando il nuovo set $\boldsymbol{\theta}^*$ come somma dei parametri del modello; la stima sui parametri θ_6 e θ_7 risulta comunque quella più difficile da ottenere. La scarsa precisione degli ultimi due parametri non pregiudica però la capacità del modello di rappresentare il sistema; dal momento che la maggiore sensibilità sulla risposta è data dalla precisione sulla stima dei primi cinque

parametri, risulta infatti che l'errore di predizione della risposta del sistema è comunque inferiore (l'integrale temporale dell'errore è pari a 0.924) rispetto al caso non riparametrizzato.

Tabella A2.1 Stime parametriche ottenute per il set θ^* (3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)).

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.deviation	t_{value} 95%
θ_1^*	1	1.162	0.07145	6.851
θ_2^*	1	0.92599	0.03906	11.78
θ_3^*	1	0.91809	0.06827	6.685
θ_4^*	1	1.1048	0.1064	5.164
θ_5^*	1	1.0443	0.0823	6.308
θ_6^*	1	1.162	0.6147	0.9398
θ_7^*	1	0.93851	0.577	0.8086
Reference t_{value} 95%				1.6787

Tabella A2.2 Matrice di correlazione fra i parametri stimati (3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)). In grassetto vengono indicati i termini che presentano un alto valore di correlazione.

	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7
s_1	1.0000	0.204	0.816	-0.846	0.44	0.00004	-0.00251
s_2	0.204	1.0000	0.718	-0.649	0.0958	-0.14	0.139
s_3	0.816	0.718	1.0000	-0.987	0.383	-0.184	0.185
s_4	-0.846	-0.649	-0.987	1.0000	-0.427	0.271	-0.268
s_5	0.44	0.0958	0.383	-0.427	1.0000	-0.161	0.159
s_6	0.00004	-0.14	-0.184	0.271	-0.161	1.0000	-0.999
s_7	-0.00251	0.139	0.185	-0.268	0.159	-0.999	1.0000

Tabella A2.3 Stime parametriche ottenute per il set θ (3+3 esperimenti in parallelo con 9 campionamenti ciascuno, in presenza di incertezza iniziale sui parametri ed alto errore sulla misura ($\omega = 0.07$)).

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.deviation
θ_1	1	1.162	0.07145
θ_2	1	0.92599	0.03906
θ_3	1	0.91809	0.06827
θ_4	1	1.1048	0.1064
θ_5	1	1.0443	0.0823
θ_6	1	1.0763	0.543
θ_7	1	0.93851	0.577

Appendice 3

Alcune stime parametriche ottenute a partire dal set riparametrizzato

In questa Appendice si riportano per completezza le stime ottenute applicando il metodo di calcolo della varianza spiegato nel paragrafo 4.1.1 ad alcuni dei casi trattati nel lavoro di Tesi. In particolare, si riporta in Tabella A3.1 la stima ottenuta a partire dai dati relativi a θ^* riportati in Tabella 3.14, in Tabella A3.2 quella ottenuta a partire dai dati riportati in Tabella 3.18 e in Tabella A3.3 quella ottenuta a partire dai dati riportati in Tabella 4.3.

Tabella A3.1 *Stime parametriche ottenute per il set θ nel caso riparametrizzato (3 esperimenti in parallelo con campionamento discreto, $\omega = 0.02$). In grassetto si indicano i valori di standard deviation che generano valori di $t_{value}95\%$ minori rispetto a quello di riferimento.*

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.Deviation
θ_1	1	1.0122	0.1103
θ_2	1	0.97984	0.03953
θ_3	1	0.98917	0.1173
θ_4	1	1.0072	0.146
θ_5	1	1.034	0.04841
θ_6	1	0.9765	0.6279
θ_7	1	1.0324	0.8110

Tabella A3.2 *Stime parametriche ottenute per il set θ nel caso riparametrizzato in presenza di incertezza iniziale sui parametri (3 esperimenti in parallelo con campionamento discreto, $\omega = 0.02$). In grassetto si indicano i valori di standard deviation che generano valori di $t_{value}95\%$ minori rispetto a quello di riferimento.*

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.Deviation
θ_1	1	0.89467	0.04963
θ_2	1	0.96509	0.02673
θ_3	1	0.88828	0.07367
θ_4	1	1.1826	0.1446
θ_5	1	0.97241	0.03374
θ_6	1	1.123	0.713
θ_7	1	0.876	0.693

Tabella A3.3 Stime parametriche ottenute per il set θ nel caso riparametrizzato in presenza di incertezza iniziale sui parametri (3 esperimenti in parallelo con campionamento discreto, $\omega = 0.07$). In grassetto si indicano i valori di standard deviation che generano valori di t_{value} 95% minori rispetto a quello di riferimento.

Parametro	Valore vero normalizzato	Stima	St.Deviation
θ_1	1	0.9168	0.1989
θ_2	1	0.9584	0.0950
θ_3	1	0.8959	0.2760
θ_4	1	1.1737	0.5248
θ_5	1	0.9770	0.1381
θ_6	1	1.0361	2.3881
θ_7	1	0.9634	2.5205

In tutti i casi si riscontra la difficoltà di stima dei parametri maggiormente correlati anche con l'applicazione della riparametrizzazione della progettazione; d'altro canto si può notare come, per il caso in cui l'errore sulle misure è maggiore (Tabella A3.3), i risultati ottenuti con l'applicazione del metodo di riparametrizzazione risultino migliori, in termini sia di accuratezza sia di precisione, rispetto al caso non riparametrizzato.

Riferimenti Bibliografici

- Andes, D. e W. A. Craig (2002). Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int. J. of Antimicrob. Ag.*, **19**, 261-268.
- Asprey, S. P. e S. Macchietto (2000). Statistical tools for optimal dynamic model building. *Comput. Chem. Eng.*, **24**, 1261-1267.
- Ballan, C. C. (2011). *Progettazione ottimale di esperimenti per l'identificazione di modelli farmacodinamici sulla resistenza batterica agli antibiotici*. Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali, DIPIC, Università di Padova.
- Bard, Y. (1977). *Nonlinear parameter estimation*. Academic Press, New York (U.S.A.).
- Box, G. E. P. e H. L. Lucas (1959). Design of experiments in non-linear situations. *Biometrika*, **46**, 77-90.
- Chapman, M. J., K. R. Godfrey, M. J. Chappell e N. D. Evans (2003). Structural identifiability of non-linear systems using linear/non-linear splitting. *Int. J. Control.*, **76**, 209-216.
- Chen, B. H., S. Bermingham, A. H. Neumann, H. J. M. Kramer e S. P. Asprey (2004). On the design of optimally informative experiments for dynamic crystallization process modeling. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **43**, 4889-4902.
- Cobelli, C. (2007). *Identificazione di Modelli e Identificabilità a Priori*. Appunti per il Corso di Modelli e Controllo di Sistemi Biologici 2, DEI, Università di Padova.
- Danhof, M., E. C. M. de Lange, O. E. Della Pasqua, B. A. Ploeger e R. A. Voskuyl (2008). Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling in translational drug research. *Trends Pharmacol. Sci.*, **29**, 186-191.
- Evans, N. D., K. R. Godfrey, M. J. Chapman, M. J. Chappell, L. Aarons e S. B. Duffull (2001). An identifiability analysis of a parent-metabolite pharmacokinetic model for ivabradine. *J. Pharmacokinet. Phar.*, **28**, 93-105.
- Fisher, R. A. (1935). *The design of the experiments*. Oliver & Boyd, Edinburgh (U.K.).
- Franceschini, G. e S. Macchietto (2008). Model-based design of experiments for parameter precision: State of the art. *Chem. Eng. Sci.*, **63**, 4846-4872.
- Galvanin, F. (2010). *Optimal model-based design of experiments in dynamic systems: novel techniques and unconventional applications*. Ph.D. Thesis, DIPIC, Università di Padova.
- Galvanin, F., M. Barolo e F. Bezzo (2009). Online model-based redesign of experiments for parameter estimation in dynamic systems. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **48**, 4415-4427.
- Galvanin, F., M. Barolo, S. Macchietto e F. Bezzo (2009). Optimal design of clinical tests for the identification of physiological models of type 1 diabetes mellitus. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **48**, 1989-2002.

- Galvanin, F., S. Macchietto e F. Bezzo (2007). Model-based design of parallel experiments. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **46**, 871-882.
- Hill, A. V. (1910). The possible effects of the aggregations of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.*, **40**, 4-7.
- Jusko, W. J. e H. C. Ko (1994). Physiologic indirect response models characterize diverse types of pharmacodynamic effects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **56**, 406-419.
- Levison, M. E. (2004). Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infect Dis. Clin. N. Am.*, **18**, 451-465.
- Mouton, J. W., M. N. Dudley, O. Cars, H. Derendorf e G. L. Drusano (2005). Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J. Antimicrob. Chemother.*, **55**, 601-607.
- Munack, A., C. Posten (1989). Design of optimal dynamical experiments for parameter estimation. In: *Proceedings of the 1989 American Control Conference*, Pittsburgh (U.S.A.).
- Pukelsheim, F. (1993). *Optimal Design of Experiments*. J. Wiley & Sons, New York (U.S.A.).
- Schwaab, M., L. P. Lemos e J. C. Pinto (2008). Optimum reference temperature for reparametrization of the Arrhenius equation. Part 2: Problems involving multiple reparametrizations. *Chem. Eng. Sci.*, **63**, 2895-2906.
- Shaw, B. M. (1999), *Statistical issue in kinetic modeling of gas-phase ethylene copolymerisation*. Ph.D. Thesis, Queen's University, Canada.
- Tam, V. H., A. N. Schilling e M. Nikolau (2005a). Modelling time-kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem. *J. Antimicrob. Chemother.*, **55**, 699-706.
- Zullo, L. (1991). *Computer aided design of experiments. An engineering approach*. Ph.D. Thesis, University of London, U.K.

Ringraziamenti

Un ringraziamento speciale al **Prof. Fabrizio Bezzo** e al **Prof. Massimiliano Barolo** per la costante supervisione durante questi mesi di lavoro e per l'attenzione dimostrata verso la persona oltre che verso lo studente.

Un grazie sincero al **Dr. Federico Galvanin**, che mi ha guidato giorno dopo giorno con pazienza indescrivibile nel tentativo di farmi scoprire l'universo infinito e complesso del MBD_oE; grazie per essere stato un faro costante durante questi sei mesi di Tesi dando una direzione ben precisa a un lavoro che altrimenti sarebbe stato soggetto a una distribuzione random di eventi, tanto per rimanere in tema...

Grazie a tutte le persone che ho conosciuto al CapeLab: a **Pierantonio Facco**, **Emanuele Tomba**, **Ricardo Andrés Ortiz Gutiérrez**, **Sara Giarola**, **Matteo Ottavian**, un grazie cumulativo per le innumerevoli e piacevoli discussioni fatte in pausa caffè e per il clima che mi ha aiutato a vivere con meno ansia quest'ultima tappa della vita universitaria; un grazie anche a **Carlo Camillo Ballan**, **Marialuisa De Martin**, **Andrea Bernardi**, **Federico Caldana** e **Silvia Dottor** per aver condiviso insieme quest'ultimo periodo di Tesi e per aver sopportato l'assenza del mio badge durante i pasti in mensa.

Un ringraziamento doveroso per il reparto di Neurochirurgia, di Radioterapia Oncologica e di Oncologia dell'Ospedale Cà Foncello di Treviso, in particolare al **Dr. Pierluigi Longatti**, al **Dr. Fabio Ferrarese** e al **Dr. Stefano Lamon** senza i quali non avrei mai potuto raggiungere questo traguardo.

Infine grazie alla mia famiglia e a tutti i miei amici: il solo fatto di poter contare su di voi è e sarà sempre la motivazione che mi spingerà a vivere con lucida e serena follia al di là di ogni problema che la vita riserverà.