

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Matematické modelování na buněčné úrovni:
enzymatická kinetika, dynamika infekce a
farmakologie**

Diplomová práce

Bc. Michaela Malíková

Vedoucí práce: doc. Ing. Luděk Berec, Dr.

České Budějovice 2018

Bibliografické údaje

Bc. Malíková M., 2018: Matematické modelování na buněčné úrovni: enzymatická kinetika, dynamika infekce a farmakologie. [Mathematical modelling at the cellular level: enzyme kinetics, infection dynamics and pharmacology. Mgr. Thesis, in Czech] - 94 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato práce se zabývá matematickým modelováním vybraných biochemických a biologických procesů na buněčné úrovni. Věnuje se modelování kinetiky enzymatických reakcí, dynamiky virových infekcí a matematickým modelům ve farmakologii. Jedním jejím cílem je představit základní modely v daných oblastech a uvést čtenáře do dané problematiky. Druhým cílem je pak vytvořit a studovat původní model, který popisované oblasti matematického modelování propojí.

Annotation

This thesis concerns mathematical modelling of selected biochemical and biological processes at the cellular level. It deals with modelling of kinetics of enzymatic reactions, dynamics virus infections and mathematical models in pharmacology. One of its aims is to review the basic models in the given areas and to introduce the reader to the specific fields. The other aim is then to develop and study an original model that links the considered areas of mathematical modelling.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 7. 12. 2018

.....

podpis

Poděkování

Chtěla bych na tomto místě poděkovat mému školiteli doc. Ing. Lud'ku Berecovi, Dr. za odborné vedení práce, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování magisterské práce věnoval.

Obsah

1	Úvod	1
2	Kinetika enzymatických reakcí	4
2.1	Chemická kinetika	4
2.2	Kinetika Michaelise-Mentenové	5
2.3	Hledání úplného řešení - technika singulární perturbace	9
2.4	Inhibice a kooperace	15
2.4.1	Kompetitivní inhibice	15
2.4.2	Akompetitivní inhibice	16
2.4.3	Nekompetitivní inhibice	20
2.4.4	Kooperace	22
2.5	Aktuální výzkum v oblasti kinetiky enzymatických reakcí	23
2.6	Rozpad produktu v základní enzymatické reakci	29
3	Modelování virových infekcí	31
3.1	HIV	31
3.1.1	Rozšíření základního modelu HIV infekce	34
3.2	Chřipka	39
3.2.1	Rozšíření základního modelu infekce chřipky	43
3.3	Aktuální výzkum v modelování virových infekcí	46
4	Matematické modely ve farmakologii	52

4.1	Farmakokinetika	53
4.2	Farmakodynamika	56
4.3	Farmakokineticko-dynamické modely	58
4.3.1	Rozšíření základního modelu	60
4.4	Aktuální výzkum v oblasti modelování ve farmakologii	61
5	Komplexní model léčby virové infekce	66
5.1	Abstrakt	66
5.2	Úvod	66
5.3	Metodika	67
5.3.1	Vliv léku na růst populace virionů	69
5.3.2	Vliv léku na mortalitu populace virionů	71
5.4	Výsledky	72
5.4.1	Analýza modelu (5.2)	72
5.4.2	Analýza modelu (5.6)	75
5.4.3	Analýza modelu (5.7)	77
5.4.4	Analýza modelu (5.8)	79
5.5	Diskuze	80
6	Závěr	84
7	Přílohy	89

Kapitola 1

Úvod

Matematické modely jsou důležitým teoretickým nástrojem mnoha vědních oborů. Své uplatnění nacházejí v různých odvětvích, například v biologii, chemii, klimatologii, kosmonautice či ekonomii. Matematické modely jsou pouze aproximací reálných systémů. Umožňují však odhalit vztahy mezi jednotlivými složkami takových systémů, můžeme díky nim předpovídat různé situace či chování složek.

Tato magisterská práce je věnována matematickým modelům v oblasti kinetiky enzymatických reakcí, dynamiky virových infekcí a modelování v oblasti farmakologie. Jedním z cílů práce je vytvořit přehled základních modelů používaných v těchto oblastech, který by se dal použít jako studijní materiál i na matematicko-biologickém semináři. Práce také poskytuje čtenáři případné informace o literatuře k dané problematice. Druhým cílem práce je pak vytvoření a studium původního modelu, který všechny uvedené oblasti propojí.

Kromě této úvodní kapitoly je práce rozdělena do čtyř kapitol. První tři kapitoly mají pedagogický charakter, popisují modelování v jednotlivých studovaných oblastech a tvoří jakýsi literární úvod k poslední kapitole. Většina obsahu těchto kapitol je převzata z literatury, nicméně některé věci, které byly v literatuře pouze zmíněny, jsou v práci uvedeny podrobněji a jsou zde spočítány (např. ekvilibria základního modelu HIV infekce nebo dvousložkové odbourávání léku u farmakokinetických modelů).

V kapitole 2 věnované modelování kinetiky enzymatických reakcí si odvodíme vzorec pro

rychlost takové chemické reakce. Dále si představíme úplné řešení systému diferenciálních rovnic popisujícího změny, ke kterým při reakci dochází. Také si popíšeme, jakým způsobem je ovlivněna rychlost enzymatické reakce za přítomnosti inhibitoru. Podíváme se na kooperaci, ke které může při reakci substrátu s enzymem docházet. Poslední část kapitoly je věnovaná některým aktuálním výsledkům výzkumu v oblasti kinetiky enzymatických reakcí. Představíme si studii zabývající se modelováním kinetiky produkce cyklodextrinu katalyzovanou enzymy Toruzymem a glukonotransferázou a studii věnovanou matematickému modelování kinetiky současného zcukernatění a fermentace celulózy na ethanol. Jak je již zmíněno výše, matematické modely jsou důležitým teoretickým nástrojem, protože mimo jiné pomáhají simulovat spoustu prakticky netestovatelných situací. Stejně tomu je i v oblasti modelování enzymatické kinetiky.

Třetí kapitola představuje matematické modely v oblasti dynamiky virové infekce. Pro práci jsme si vybrali infekci HIV a chřipky, dvě v tomto ohledu nejsledovanější infekce. Pro obě onemocnění představíme základní model a dvě jeho rozšíření. V případě HIV infekce v rámci rozšíření uvažujeme nejprve činnost lymfocytů, poté uvádíme, jak se dynamika infekce změní za přítomnosti léků. U chřipkové infekce zavádíme pro bližší přiblížení skutečnosti určitou dobu latence. Ve druhém rozšíření pak uvažujeme přítomnost interferonů a populaci buněk odolných vůči infekci. V závěru kapitoly si přiblížíme dvě nové studie v této oblasti. První z nich se zabývá heterogenitou šíření chřipky a jejím vlivem na vznik epidemií, druhá studie je věnována modelování postkoinfekce virů chřipky spolu s bakterií *Streptococcus pneumoniae* způsobující zápal plic. Modelování virové dynamiky je nesmírně důležitým teoretickým nástrojem, protože infekce představují vážný problém ohrožující lidi na životě. Pro řešení infekčních krizí je podstatné pochopit průběh infekce, což nám umožňuje také modelování.

Ve čtvrté kapitole se budeme věnovat matematickému modelování ve farmakologii. Zde si popíšeme základní farmakokinetické a farmakodynamické modely. A stejně jako u předchozích kapitol, i zde si představíme dvě nedávné vědecké studie. V rámci první studie autoři díky matematickému modelu odhadují dávku doxorubicinu, který slouží k léčbě rakoviny prsu. Druhá studie popisuje vliv erenumabu na kapsainem indukovaný dermální průtok krve. Díky matematickým modelům v oblasti farmakologie můžeme lépe pochopit interakce léku s organismem, a snáze díky nim pochopíme rozdílnost mezi jednotlivými pacienty a experimenty.

Každá z těchto kapitol se tak skládá ze tří částí: představení základního modelu, představení možných praktických rozšíření a představení některého současného výzkumu. Cílem představení současného výzkumu je zejména ukázat, že uvedené základní modely tvoří jádro současného teoretického výzkumu a jejich znalost je tak i pro moderní vědu zásadní.

Poslední kapitola práce je autorská a je věnována vývoji a studiu původního modelu, který propojuje všechny tři představené oblasti. Struktura této kapitoly je odlišná, je členěna podobně jako vědecké práce na úvod, metodiku, výsledky a diskuzi. Začínáme základním modelem, který popisuje infekci chřipky. Poté přidáváme do organismu lék, čímž připojujeme farmakologickou část a nakonec uvažujeme potřebu aktivace léku enzymem. U výsledného modelu sledujeme vliv rychlosti, s jakou je do organismu kontinuálně dodáván lék (nebo jeho prekurzor), na dynamiku populace virionů, tj. kdy dosáhne populace maxima.

Pro simulace převzatých i původních matematických modelů, které mají všechny tvar systému obyčejných diferenciálních rovnic prvního řádu, byl použit program Wolfram Mathematica 10.0. V tomto programu se pomocí příkazu `NDSolve` dá získat řešení, které můžeme pomocí příkazu `Plot` vykreslit. Většina obrázků představující numerické řešení nějakého systému, byla získána právě tímto způsobem. Obrázky pro znázornění účinku inhibitoru byly vytvořeny v programu Geogebra Classic 5. Výhodou tohoto programu je bezesporu jeho dostupnost a to, že je v českém jazyce.

Kapitola 2

Kinetika enzymatických reakcí

Pokud zjišťujeme průběh nějaké chemické reakce, zajímá nás hledisko kinetické a hledisko termodynamické. Zjednodušeně můžeme říci, že termodynamika nám říká, zda reakce proběhne a kinetika, jak rychle daná reakce proběhne. Termodynamice se zde nevěnujeme, čtenář si může tuto problematiku nastudovat například v kapitole 5.1.2 práce [8]. My se v této kapitole zaměříme na kinetiku chemické reakce. Definujeme okamžitou rychlost chemické reakce a věnujeme se odvození této rychlosti pro reakci enzymatickou. Uvádíme také, jak přítomnost inhibitoru či možnost kooperace ovlivní rychlost této reakce. Více informací o daném tématu může čtenář nalézt v literatuře [11, 7, 4, 8, 14]. V poslední části kapitoly představíme dva aktuální výzkumy v této oblasti.

2.1 Chemická kinetika

Chemická kinetika je obor fyzikální chemie studující rychlost chemické reakce. V chemii se rychlost reakce definuje jako časová změna látkového množství reagující látky.

Podívejme se na jednoduchý příklad a zkusme popsat rychlost reakce. Mějme reakci



kde k_1 a k_{-1} jsou rychlostní konstanty. Kinetika chemických reakcí vychází z faktu, že rychlost chemické reakce je v každém okamžiku úměrná aktivní hmotě reagujících látek (The Law of

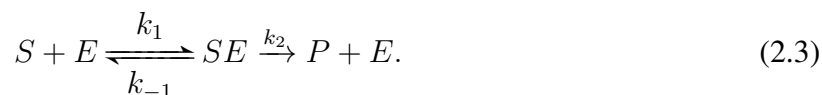
Mass Action). Tento zákon je znám již od 19. století, kdy jej představili pánové P. Waage a C. M. Guldberg. Vyjádřením rychlosti reakce pro výchozí látky i pro produkty získáme tyto tři diferenciální rovnice:

$$\begin{aligned}\frac{d[A]}{dt} &= -k_1[A][B] + k_{-1}[C], \\ \frac{d[B]}{dt} &= -k_1[A][B] + k_{-1}[C], \\ \frac{d[C]}{dt} &= k_1[A][B] - k_{-1}[C],\end{aligned}\tag{2.2}$$

kde $[X]$ značí koncentraci látky X . Jednotlivé rovnice popisují změnu koncentrace v čase. Podívejme se blíže na první z nich. Člen $-k_1[A][B]$ vyjadřuje úbytek látky A ve prospěch vzniku látky C . Aby vznikla látka C musí spolu reagovat látky A a B , proto se v daném členu vyskytuje i koncentrace látky B ; k_1 je rychlostní konstanta této reakce. Druhý člen $k_{-1}[C]$ vyjadřuje nárůst množství látky A zpětnou reakcí, kdy se molekula C rozpadá na výchozí látky A a B s rychlostní konstantou k_{-1} .

2.2 Kinetika Michaelise-Mentenové

Nyní předchozí úvahy aplikujme na reakce enzymatické. Budeme uvažovat základní enzymatickou reakci, kdy reaguje substrát S s enzymem E za vzniku komplexu enzym-substrát SE , který se může zpětnou reakcí rozpadnout na výchozí látky nebo se přemění na produkt P za uvolnění enzymu:



Dynamiku reakce (2.3) můžeme popsat pomocí následujícího systému obyčejných diferenci-

álních rovnic:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[S]}{dt} &= -k_1[E][S] + k_{-1}[ES], \\
 \frac{d[E]}{dt} &= -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_2)[ES], \\
 \frac{d[ES]}{dt} &= k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES], \\
 \frac{d[P]}{dt} &= k_2[ES].
 \end{aligned}
 \tag{2.4}$$

Pro tento systém (2.4) navíc předpokládáme následující počáteční podmínky:

$$[S](0) = s_0, [E](0) = e_0, [ES](0) = 0, [P](0) = 0. \tag{2.5}$$

Vzhledem k systému (2.4) a podmínkám (2.5) vidíme, že rychlost reakce je funkcí času. Na obrázku 2.1 vidíme časové změny koncentrací jednotlivých složek systému. Na počátku dochází k rychlému poklesu koncentrace substrátu a enzymu. Vidíme, že tak, jak ubývá substrát, přibývá produkt. Vzhledem k rychlé dynamice systému nepozorujeme u křivky pro produkt na počátku žádnou prodlevu. Stejný trend vidíme i v případě dvojice enzym a komplex enzym-substrát.

Řešme nyní poslední diferenciální rovnici systému (2.4), která popisuje rychlost reakce z hlediska produktu P . Získáme řešení tvaru

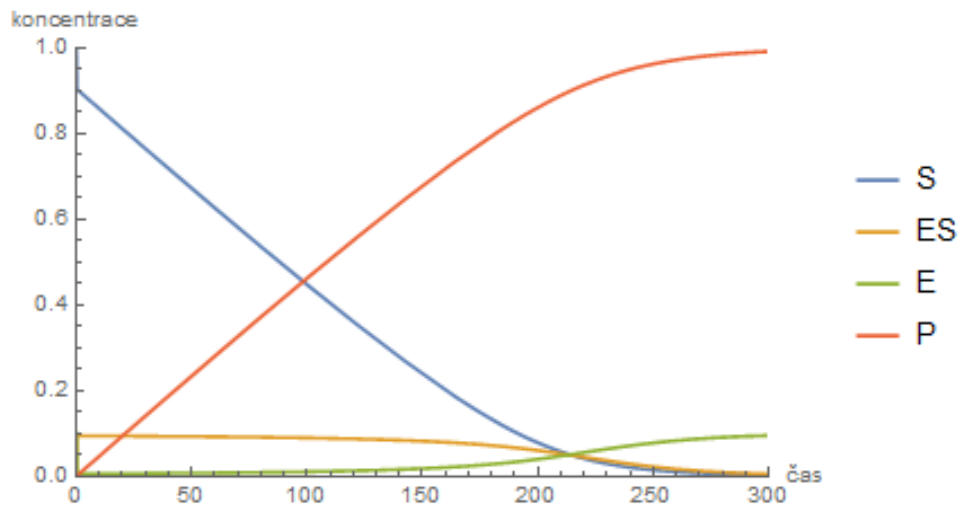
$$[P](t) = k_2 \int_0^t [ES](t') dt'. \tag{2.6}$$

Vzhledem k tomu, že enzym E vystupuje v reakci jako katalyzátor, není během reakce spotřebováván. Součet koncentrace volného a vázaného enzymu je tedy v čase konstantní a platí:

$$\frac{d[E]}{dt} + \frac{d[ES]}{dt} = 0 \Rightarrow [E](t) + [ES](t) = e_0. \tag{2.7}$$

Po dosazení $[E] = e_0 - [ES]$ se tak původní systém (2.4) zjednoduší pouze na dvě obyčejné diferenciální rovnice:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[S]}{dt} &= -k_1 e_0 [S] + (k_1 [S] + k_{-1}) [ES], \\
 \frac{d[ES]}{dt} &= k_1 e_0 [S] - (k_1 [S] + k_{-1} + k_2) [ES],
 \end{aligned}
 \tag{2.8}$$



Obrázek 2.1: Numericky vypočtené průběhy koncentrací substrátu, produktu, enzymu a komplexu enzym-substrát z modelu (2.4) pro rychlostní konstanty $k_1 = e^3$, $k_{-1} = 1$, $k_2 = 0.05$ a pro počáteční podmínky $[S](0) = 1 \text{ mol/objem}$ a $[E](0) = 0.1 \text{ mol/objem}$.

s počátečními podmínkami:

$$[S](0) = s_0, [ES](0) = 0. \quad (2.9)$$

Pro analýzy takových systémů se standardně předpokládá rychlá dynamika koncentrace komplexu. To znamená, že množství komplexu enzym-substrát se velmi rychle přizpůsobí změnám ostatních složek systému, a tedy $\frac{d[ES]}{dt} \approx 0$. Vidíme to také na obrázku 2.1, kde na počátku dojde k velmi rychlé změně substrátu S a komplexu enzym-substrát ES .

V případě platnosti této aproximace můžeme z druhé rovnice systému (2.8) vyjádřit koncentraci komplexu $[ES]$ v závislosti na koncentraci substrátu $[S]$ jako

$$[ES](t) = \frac{e_0[S](t)}{[S](t) + K_m}, \quad (2.10)$$

kde

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}. \quad (2.11)$$

Konstanta K_m ve vztahu (2.10) charakterizující katalytické vlastnosti enzymu se nazývá konstanta Michaelise-Mentenové.

Po dosazení za $[ES]$ z výrazu (2.10) do první rovnice systému (2.8) dostáváme vzorec pro rychlost reakce z hlediska substrátu

$$v = \frac{d[S]}{dt} = -\frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m}, \quad (2.12)$$

kde V_{max} je maximální rychlost reakce a platí $V_{max} = k_2e_0$. Aproximace (2.12) je známa jako kvazi-rovnovážná a nazývá se též kinetika Michaelise-Mentenové [11]. Ze vztahu (2.12) vidíme, že číselně je hodnota konstanty Michaelise-Mentenové K_m rovna koncentraci substrátu, při které je dosaženo poloviny maximální rychlosti V_{max} enzymatické reakce (2.3). Protože za předpokladu $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ platí $\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt}$, vyjadřuje vztah (2.12) jednak rychlost úbytku substrátu, ale také (s opačným znaménkem) rychlost přírůstku produktu a tedy rychlost enzymatické reakce (2.3). Nakonec můžeme vyřešit rovnici (2.12) s počáteční podmínkou $[S](0) = s_0$. Získáme implicitní řešení ve tvaru:

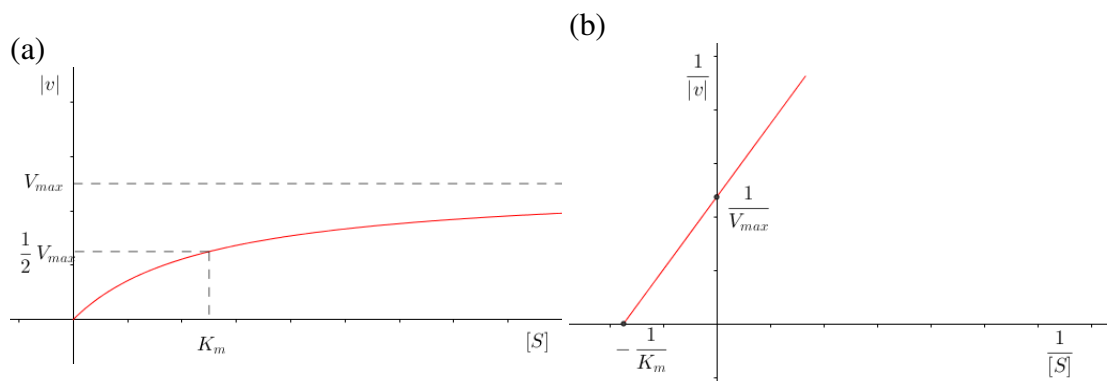
$$[S](t) + K_m \ln [S](t) + V_{max}t = s_0 + K_m \ln s_0. \quad (2.13)$$

Získali jsme řešení pro komplex enzym-substrát, substrát a produkt, ale nedodrželi jsme počáteční podmínku pro koncentraci komplexu $[ES](t)$ (2.9), protože z rovnice (2.10) plyne $[ES](0) = \frac{e_0[S](0)}{[S](0) + K_m}$. Jak uvidíme v následující části 2.2, systém (2.12) je dobrou aproximací systému (2.8) v čase dále od nuly, tedy po většinu času reakce, za předpokladu, že množství enzymu je výrazně menší než počáteční množství substrátu ($e_0 \ll s_0$).

Křivka znázorňující kinetiku Michaelise-Mentenové má hyperbolický průběh (obr. 2.2a). Z grafu však nemůžeme přesně určit hodnotu maximální rychlosti V_{max} ani hodnotu konstanty Michaelise-Mentenové K_m , která odpovídá $\frac{V_{max}}{2}$. Proto je výhodnější a názornější zobrazení pomocí přímky. Jednou z aproximací rovnice Michaelise-Mentenové (2.12) je rovnice Lineweaver-Burka, která má následující tvar a jejímž grafickým znázorněním je přímka (obr. 2.2b):

$$\frac{1}{|v|} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}. \quad (2.14)$$

Z průsečíků takto získané přímky s jednotlivými osami můžeme určit jak hodnotu maximální rychlosti V_{max} pomocí průsečíku s osou y , tak hodnotu konstanty Michaelise-Mentenové K_m pomocí průsečíku s osou x (obr. 2.2b).



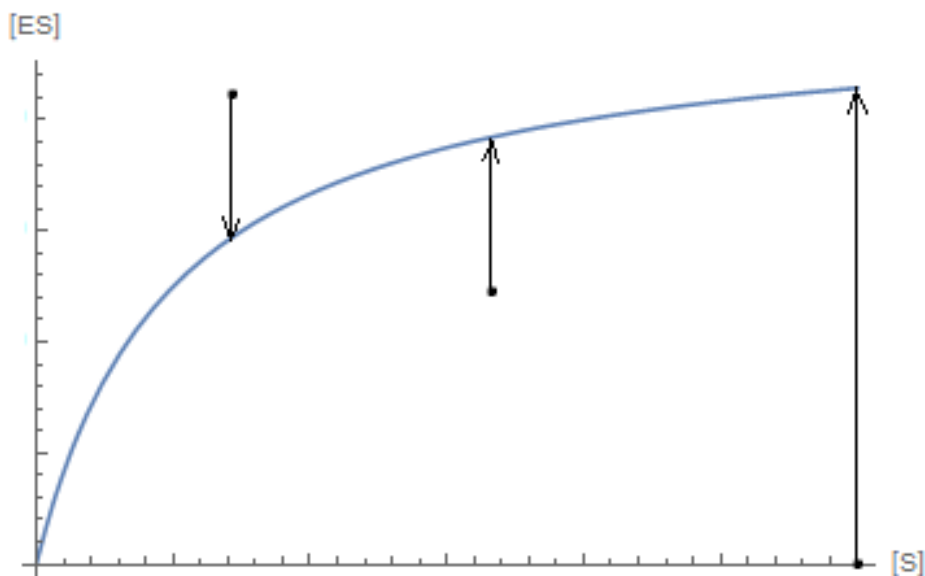
Obrázek 2.2: Grafické vyjádření rychlosti enzymatické reakce (a) dle Michaelise-Mentenové (2.12) a (b) dle Lineweavera a Burka (2.14).

Zde končí většina klasických textů zaměřených na kinetiku enzymatických reakcí. Tyto texty často implicitně přepokládají, že dynamika reakce daná rovnicemi (2.10) a (2.12) je dostatečně dobrou aproximací skutečné dynamiky dané systémem (2.4). Jádrem této aproximace je rychlá dynamika (2.10) a pomalá dynamika (2.12), viz také obr. 2.3. Předchozí úvahy nás však nutí položit si pár otázek. Jak rychlá je dynamika systému (2.4) poblíž počátku času $t = 0$? Pro jaké podmínky na parametry je aproximace (2.10) a (2.12) dostatečně dobrá? A co máme dělat v situaci, kdy tyto podmínky nejsou splněny? Pro odpovědi je třeba podívat se na dynamiku systému (2.8) matematicky přesněji, z pohledu teorie singulárních perturbací.

2.3 Hledání úplného řešení - technika singulární perturbace

V této části kapitoly budeme vycházet z práce [11]. Pro analýzu kvazi-rovnovážného stavu musíme nejdříve zavést bezrozměrné veličiny a model přeparametrizovat s využitím například následujících vztahů (existuje více možných způsobů přeparametrizování):

$$\begin{aligned} \tau &= k_1 e_0 t, \quad u(\tau) = \frac{[S](t)}{s_0}, \quad v(\tau) = \frac{[ES](t)}{e_0} \\ \lambda &= \frac{k_2}{k_1 s_0}, \quad K = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 s_0} = \frac{K_m}{s_0}, \quad \varepsilon = \frac{e_0}{s_0}. \end{aligned} \tag{2.15}$$



Obrázek 2.3: Dynamika systémů (2.10) a (2.12). Modrá křivka je graf funkce dané předpisem (2.10), pohyb po ní udává rovnice (2.12), černé šipky znázorňují rychlou dynamiku systému.

Přepišme nyní rovnice (2.8) pro $[S]$ a $[ES]$ pomocí nově zavedených proměnných a parametrů (2.15). Získáme systém:

$$\begin{aligned} \frac{du}{d\tau} &= -u + (u + K - \lambda)v, \\ \varepsilon \frac{dv}{d\tau} &= u - (u + K)v \end{aligned} \quad (2.16)$$

s počátečními podmínkami

$$u(0) = 1, \quad v(0) = 0. \quad (2.17)$$

Rádi bychom získali řešení nelineárního systému diferenciálních rovnic (2.16), které však nemůžeme vypočítat analyticky v jednoduchém tvaru. Vidíme však, že blízko $\tau = 0$ je $\frac{du}{d\tau} < 0$ takže můžeme říci, že proměnná u zpočátku klesá z hodnoty $u = 1$. Podobně pro malé τ je $\frac{dv}{d\tau} > 0$. Proměnná v tedy zpočátku roste z hodnoty $v = 0$ až do hodnoty $v = \frac{u}{u+K}$, kde platí $\frac{dv}{d\tau} = 0$. Poté, co v dosáhne svého maxima, začne klesat k nule, stejně jako u , které klesá pro všechna t . Protože $[E] = e_0 - [ES] = e_0(1 - v)$, koncentrace enzymu $[E](t)$ nejprve klesá z e_0 a následně se pro čas $t \rightarrow \infty$ vrací na hodnotu e_0 .

Uvažujme systém (2.16) a předpokládejme $\varepsilon \ll 1$. Fakt, že parametr $0 < \varepsilon \ll 1$ násobí v modelu (2.16) derivaci, naznačuje, že máme co dělat s tzv. úlohou singulární perturbace. Rozvíňme řešení u a v do Taylorovy řady podle parametru ε v okolí bodu $\varepsilon = 0$:

$$u(\tau, \varepsilon) = \sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n u_n(\tau), \quad (2.18)$$

$$v(\tau, \varepsilon) = \sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n v_n(\tau).$$

Rozvoje (2.18) dosadíme do systému (2.16) a poté položíme sobě rovné členy se stejným exponentem u ε . Tím získáme posloupnost diferenciálních rovnic pro $u_n(\tau)$ a $v_n(\tau)$. Pro $n = 0$ dostáváme systém:

$$\frac{du_0}{d\tau} = -u_0 + (u_0 + K - \lambda)v_0, \quad (2.19)$$

$$0 = u_0 - (u_0 + K)v_0$$

s počátečními podmínkami

$$u_0(0) = 1, v_0(0) = 0. \quad (2.20)$$

Vidíme, že tento přístup přináší jisté obtíže, protože druhá rovnice (2.19) je algebraická a nesplňuje počáteční podmínku (2.20): pokud $u_0 = 1$, pak $v_0 = \frac{1}{1+K} \neq 0$. Pokud budeme řešit systém (2.19), získáme:

$$v_0 = \frac{u_0}{u_0 + K}, \quad (2.21)$$

$$\frac{du_0}{d\tau} = -\lambda \frac{u_0}{u_0 + K}$$

a proto

$$u_0(\tau) + K \ln u_0(\tau) + \lambda\tau = A. \quad (2.22)$$

Pokud navíc uplatníme počáteční podmínku $u_0(0) = 1$, pak $A = 1$. Máme tedy implicitně dané řešení pro $u_0(\tau)$ a odpovídající $v_0(\tau)$:

$$u_0(\tau) + K \ln u_0(\tau) + \lambda\tau = 1, \quad (2.23)$$

$$v_0(\tau) = \frac{u_0(\tau)}{u_0(\tau) + K},$$

kteřé je shodné s řešením (2.13) a (2.10). Je třeba znova zdůraznit, že toto řešení neplatí pro všechna $\tau \geq 0$, protože není splněna podmínka $v_0(0) = 0$. Vzhledem k tomu, že systém (2.19)

obsahuje pouze jednu integrační konstantu a to v rovnici pro proměnnou u , nelze splnit obě počáteční podmínky (2.20) současně.

Abychom splnili počáteční podmínku $v(0) = 0$, musíme v modelu (2.16) ponechat člen ε , a přetransformovat časovou škálu v okolí nuly. Zavedeme parametr $\sigma = \frac{\tau}{\varepsilon}$, platí tedy rovnost $\varepsilon \frac{dv}{d\tau} = \frac{dv}{d\sigma}$. Pro pevné $0 < \tau \ll 1$ je díky této transformaci $\sigma \gg 1$ pro $\varepsilon \rightarrow 0$. To znamená, že velmi malé okolí $\tau = 0$ odpovídá velkému rozsahu pro σ . Dosáhli jsme tedy natažení časové škály v okolí $\tau = 0$. Využijeme nyní této transformace pro analýzu systému (2.16) v blízkosti $\tau = 0$.

Pomocí transformací

$$\sigma = \frac{\tau}{\varepsilon}, \quad U(\sigma, \varepsilon) = u(\tau, \varepsilon), \quad V(\sigma, \varepsilon) = v(\tau, \varepsilon) \quad (2.24)$$

přepíšeme systém (2.16) do tvaru

$$\begin{aligned} \frac{dU}{d\sigma} &= -\varepsilon U + \varepsilon(U + K - \lambda)V, \\ \frac{dV}{d\sigma} &= U - (U + K)V \end{aligned} \quad (2.25)$$

s počátečními podmínkami

$$U(0) = 1, \quad V(0) = 0. \quad (2.26)$$

Všimněme si, že systém (2.25) již neobsahuje malý parametr ε v rovnici pro V . Rozviňme opět jeho řešení do Taylorovy řady podle parametru ε v okolí bodu $\varepsilon = 0$:

$$\begin{aligned} U(\sigma, \varepsilon) &= \sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n U_n(\sigma), \\ V(\sigma, \varepsilon) &= \sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n V_n(\sigma). \end{aligned} \quad (2.27)$$

Substitucí těchto výrazů do (2.25) a porovnáním členů s ε^0 dostáváme systém:

$$\begin{aligned} \frac{dU_0}{d\sigma} &= 0, \\ \frac{dV_0}{d\sigma} &= U_0 - (U_0 + K)V_0 \end{aligned} \quad (2.28)$$

s počátečními podmínkami

$$U_0(0) = 1, \quad V_0(0) = 0, \quad (2.29)$$

který není nižšího řádu než původní systém (2.25). Řešení systému (2.28) s počátečními podmínkami (2.29) je

$$\begin{aligned} U_0(\sigma) &= 1, \\ V_0(\sigma) &= \frac{1}{1+K}(1 - \exp[-(1+K)\sigma]). \end{aligned} \quad (2.30)$$

Řešení (2.30) je tzv. vnitřní řešení pro u a v a to pro čas $0 < \tau \ll 1$, zatímco řešení (2.23) je tzv. vnější řešení pro všechna τ dále od nuly. Pokud $\varepsilon \rightarrow 0$, pak pro pevné $0 < \tau \ll 1$ platí $\sigma \rightarrow \infty$. Proto požadujeme, aby řešení (2.23) pro $\tau \rightarrow 0$ odpovídalo řešení (2.30) pro $\sigma \rightarrow \infty$. Potřebujeme tedy zajistit, aby na sebe vnitřní a vnější řešení navazovaly, tedy aby platilo

$$\lim_{\sigma \rightarrow \infty} [U_0(\sigma), V_0(\sigma)] = \left[1, \frac{1}{1+K} \right] = \lim_{\tau \rightarrow 0} [u_0(\tau), v_0(\tau)] \quad (2.31)$$

Jinak řečeno, hledáme integrační konstantu A v nám již známých vztazích

$$\begin{aligned} u_0(\tau) + K \ln u_0(\tau) + \lambda\tau &= A, \\ v_0(\tau) &= \frac{u_0(\tau)}{u_0(\tau) + K}. \end{aligned} \quad (2.32)$$

Aplikujme proto limitní proces (2.31) na rovnice (2.32):

$$\begin{aligned} \lim_{\sigma \rightarrow \infty} V_0(\sigma) &= \frac{1}{1+K} = \lim_{\tau \rightarrow 0} v_0(\tau) \\ \Rightarrow v_0(0) &= \frac{1}{1+K} = \frac{u_0(0)}{u_0(0) + K} \Rightarrow u_0(0) = 1 \Rightarrow A = 1. \end{aligned} \quad (2.33)$$

Nyní bychom mohli přistoupit k sestavení systémů rovnic pro $n = 1$ z rozvoju (2.18) a (2.27) a následnému výpočtu $u_1(\tau)$ a $v_1(\tau)$ a $U_1(\sigma)$ a $V_1(\sigma)$. Řešení se stává velmi komplikovaným, přestože rovnice zůstávají lineární. Pro většinu biologických systémů však platí $0 < \varepsilon \ll 1$ a příspěvek těchto dalších řešení je tak zanedbatelný. Celkově je tedy asymptotické řešení pro $0 < \varepsilon \ll 1$ a pro všechna $\tau \geq 0$ nelineární kinetiky reprezentované systémem (2.16) následující:

$$\begin{aligned} u(\tau, \varepsilon) &= u_0(\tau) + O(\varepsilon), \text{ kde } u_0(\tau) + K \ln u_0(\tau) + \lambda\tau = 1, \\ v(\tau, \varepsilon) &= \begin{cases} V_0(\tau) + O(\varepsilon), V_0(\tau) = \frac{1}{1+K} \left(1 - \exp \left[-(1+K) \frac{\tau}{\varepsilon} \right] \right), \text{ pro } 0 < \tau \ll 1 \\ v_0(\tau) + O(\varepsilon), v_0(\tau) = \frac{u_0(\tau)}{u_0(\tau) + K}, \text{ pro } 0 < \varepsilon \ll \tau \end{cases} \end{aligned} \quad (2.34)$$

K dokončení analýzy původního systému (2.4) s počátečními podmínkami (2.5) potřebujeme zapsat bezrozměrně produkt a volný enzym jako:

$$z(\tau) = \frac{[ES](t)}{s_0}, w(\tau) = \frac{[E](t)}{e_0}, \quad (2.35)$$

příčemž aplikací (2.34) pro u a v dostáváme z výrazů (2.6) a (2.7) vztahy:

$$z(\tau) = \lambda \int_0^\tau v(\tau') d\tau', \quad (2.36)$$

$$w(\tau) = 1 - v(\tau).$$

Rychlá změna komplexu enzym-substrát $v(\tau, \varepsilon)$ probíhá v čase, který je velmi krátký a pro většinu experimentů se ani nedá měřit. V řadě experimentů nebylo vnitřní řešení pro $u(\tau), v(\tau)$ nikdy pozorováno. Relevantní řešení je tedy vnější řešení $u_0(\tau)$ a $v_0(\tau)$ dané vztahy (2.23) a splňující počáteční podmínku pro $u(\tau)$. Jinými slovy říkáme, že komplex $v(\tau)$ je v rovnovážném stavu, tedy že platí $\varepsilon \frac{dv}{d\tau} \approx 0$. To znamená, že v -reakce je natolik rychlá, že je více či méně po celou dobu v (dynamickém) ekvilibriu. To je vlastně klasická hypotéza Michaelise-Mentenové o kvazi-rovnovážném stavu.

Jen jako poznámku uved' me, že systém (2.16) lze zobecnit na následující rovnice:

$$\begin{aligned} \frac{du}{d\tau} &= f(u, v), \\ \varepsilon \frac{dv}{d\tau} &= g(u, v), \quad 0 < \varepsilon \ll 1. \end{aligned} \quad (2.37)$$

Vidíme, že v -reakce je velmi rychlá v porovnání s u -reakcí. To znamená, že pro čas $\tau \gg \varepsilon > 0$ můžeme použít aproximaci

$$\frac{du}{d\tau} = f(u, v), \quad g(u, v) = 0. \quad (2.38)$$

Pokud vyřešíme algebraickou rovnici $g(u, v) = 0$, dostaneme, že $v = h(u)$, a pak:

$$\frac{du}{d\tau} = f(u, h(u)), \quad (2.39)$$

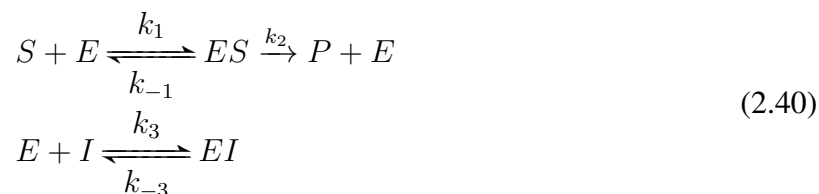
což nám dává samostaný dynamický popis u -reakce.

2.4 Inhibice a kooperace

Často nám rychlost reakce nevyhovuje. Některé chemické reakce běží příliš pomalu, je tedy žádoucí je urychlit. Jiné chemické reakce naopak běží příliš rychle nebo jsou nežádoucí. V takovém případě je třeba reakci zpomalit či zastavit. Zrychlení reakce můžeme docílit tím, že zvýšíme koncentraci reaktantů, nebo zvýšíme teplotu či přidáme katalyzátory - aktivátory. Reakcím za přítomnosti aktivátoru se v práci věnovat nebudeme. V případě, že potřebujeme reakci zpomalit, můžeme například použít katalyzátory - inhibitory. Jsou to látky strukturně velmi podobné substrátu, které se pomocí nekovalentních interakcí specificky váží na enzym a tím ovlivní rychlost reakce. Zvláštním případem je kooperace, při které může dojít jak k aktivaci, tak k inhibici. Pojd' me se na matematické modelování enzymatické kinetiky v jednotlivých případech podívat.

2.4.1 Kompetitivní inhibice

Během kompetitivní inhibice dochází k tomu, že inhibitor se díky strukturní podobnosti se substrátem může vázat do vazebního místa enzymu. Dochází tedy ke kompetici (soutěžení) mezi substrátem a inhibitorem o vazbu s enzymem. Pokud dojde k navázání substrátu na enzym, tak reakce probíhá stejně jako v případě (2.3), jak jsme již ale zmínili, může dojít i k navázání inhibitoru. Reakční schéma tedy rozšíříme i o tuto možnost (2.40). Schéma enzymatické reakce potom vypadá následovně:



Rychlost takové reakce můžeme opět vyjádřit z hlediska všech látek v reakci jako časovou změnu jejich látkového množství. Diferenciální rovnice popisující dynamiku reakcí (2.40) jsou

následující:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[S]}{dt} &= -k_1[E][S] + k_{-1}[ES], \\
 \frac{d[E]}{dt} &= -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-3}[EI] - k_3[E][I], \\
 \frac{d[ES]}{dt} &= k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES], \\
 \frac{d[P]}{dt} &= k_2[ES], \\
 \frac{d[I]}{dt} &= k_{-3}[EI] - k_3[E][I], \\
 \frac{d[EI]}{dt} &= k_3[E][I] - k_{-3}[EI].
 \end{aligned}
 \tag{2.41}$$

Získané rovnice vyřešíme obdobně jako v případě kinetiky Michaelise-Mentenové. Po úpravách popsaných v předchozí části kapitoly získáme reciprokou formu rychlostní rovnice reakce z hlediska produktu [14]:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}},
 \tag{2.42}$$

přičemž K_i je inhibiční konstanta definovaná jako disociační konstanta komplexu enzym-inhibitor:

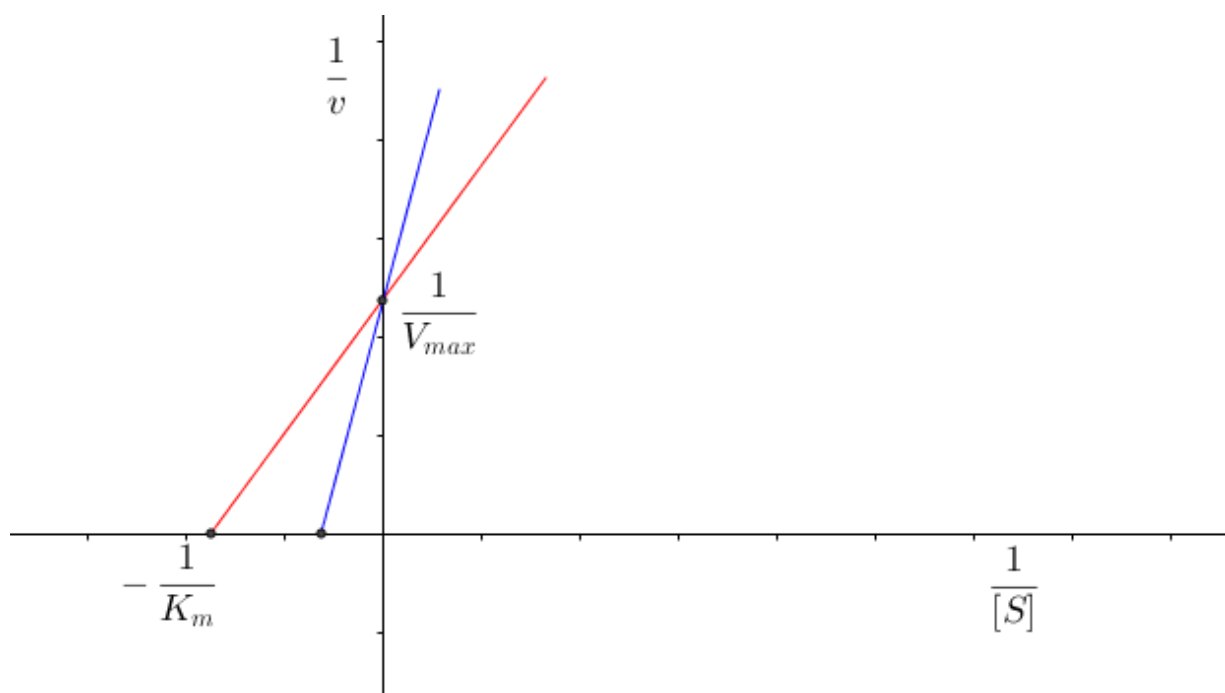
$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]},
 \tag{2.43}$$

kde $[X]$ je koncentrace látky X po ustavení rovnováhy systému (2.40).

Všimněme si, že pokud bude v rovnici (2.42) koncentrace inhibitoru nulová, tedy $[I] = 0$, dostaneme vztah (2.14) pro kinetiku Michealise-Mentenové. Koncentrace inhibitoru $[I]$ je dynamickou proměnnou systému, která závisí na čase. Kompetitivní inhibitor neovlivňuje hodnotu maximální rychlosti V_{max} , avšak jeho přítomnost v reakci zvyšuje hodnotu konstanty Michaelise-Mentenové z K_m na $K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ (obr. 2.4).

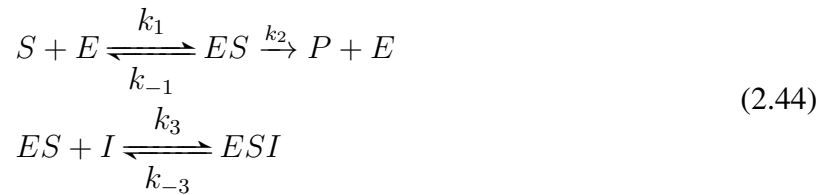
2.4.2 Akompetitivní inhibice

V případě akompetitivní inhibice nesoupeří inhibitor se substrátem o vazbu na enzym, ale váže se na komplex enzym-substrát, čímž vzniká komplex substrát-enzym-inhibitor, který neposkytuje



Obrázek 2.4: Kinetika enzymatické reakce v grafickém znázornění rovnice (2.42) dle Lineweaver a Burka bez inhibitoru $[I] = 0$ (červená) a s kompetitivním inhibitorem $[I] > 0$ (modrá).

produkt. Schéma akompetitivní inhibice je následující:



Soustava diferenciálních rovnic popisující tento chemický systém je následující:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[S]}{dt} &= -k_1[S][E] + k_{-1}[ES], \\
 \frac{d[E]}{dt} &= -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES], \\
 \frac{d[ES]}{dt} &= k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] - k_3[ES][I] + k_{-3}[ESI], \\
 \frac{d[P]}{dt} &= k_2[ES], \\
 \frac{d[I]}{dt} &= k_{-3}[ESI] - k_3[ES][I], \\
 \frac{d[ESI]}{dt} &= k_3[ES][I] - k_{-3}[ESI].
 \end{aligned}
 \tag{2.45}$$

Možná reakce akompetitivního inhibitoru s komplexem enzym-substrát ovlivní rychlost reakce následujícím způsobem [14]:

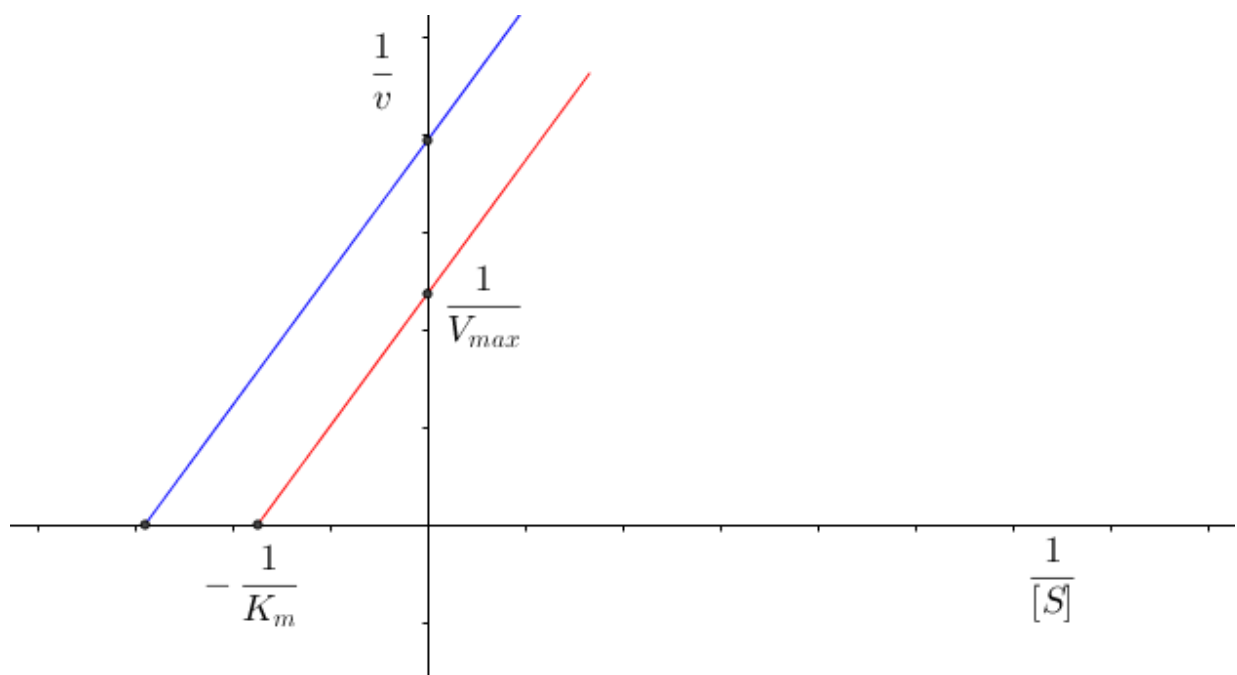
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right),
 \tag{2.46}$$

kde inhibiční konstanta K_i je definována

$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]},
 \tag{2.47}$$

kde $[X]$ představuje koncentraci látky X po ustavení rovnovážného stavu systému (2.44).

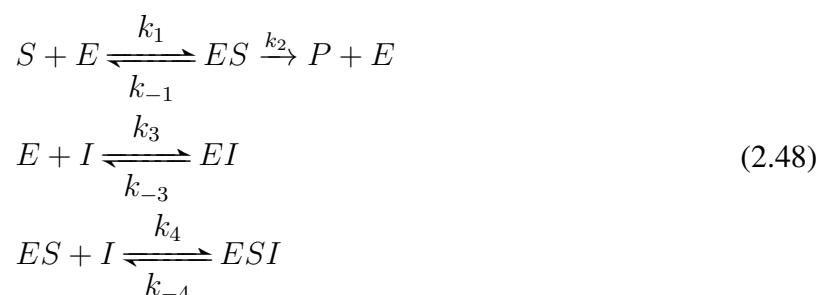
Vidíme, že oproti rychlosti neinhibované enzymatické reakce (2.14) přibyl člen $1 + \frac{[I]}{K_i}$, který určuje, jak přítomný inhibitor ovlivní rychlost reakce. Dojde k poklesu hodnoty konstanty Michaelise-Mentenové, a to v důsledku reakce komplexu enzym-substrát s inhibitorem. Touto reakcí je odčerpána část komplexu enzym-substrát, dochází tedy k posunu rovnováhy neinhibované reakce směrem doprava, tedy poklesu maximální rychlosti V_{max} (obr. 2.5).



Obrázek 2.5: Kinetika enzymatické reakce v grafickém znázornění rovnice (2.46) dle Lineweaver a Burka bez inhibitoru $[I] = 0$ (červená) a s akompetitivním inhibitorem $[I] > 0$ (modrá).

2.4.3 Nekompetitivní inhibice

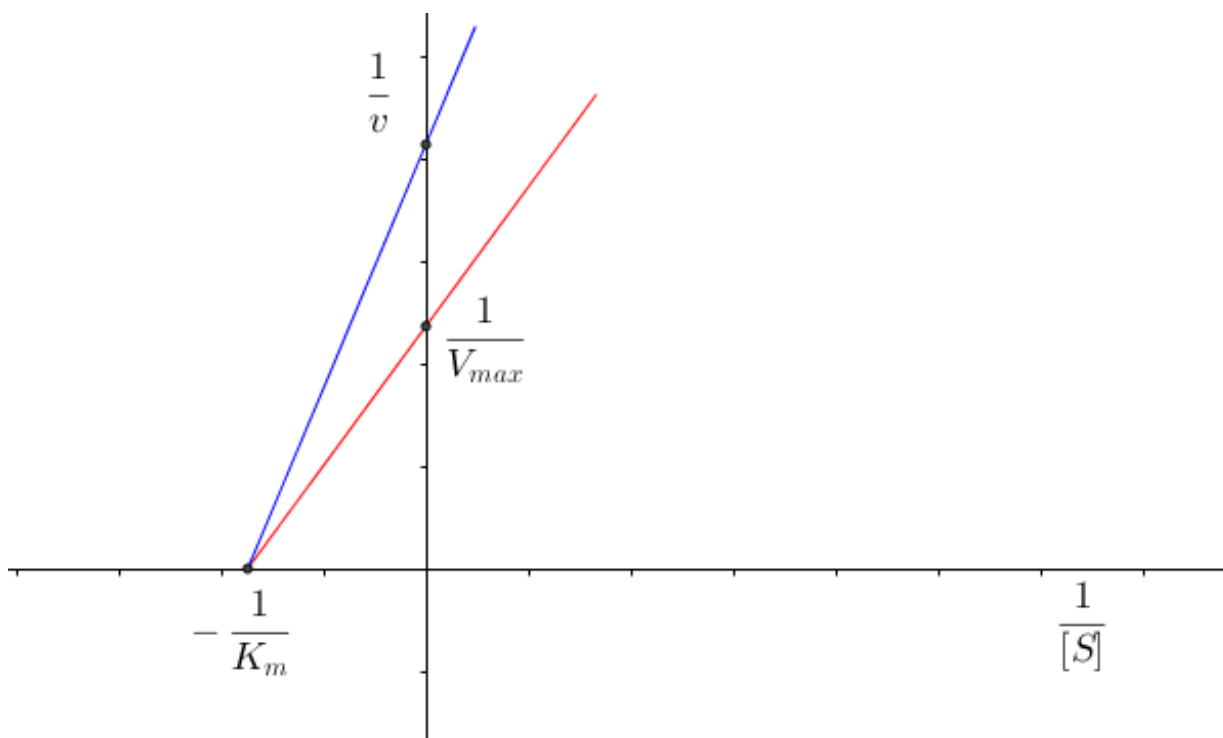
Posledním typem inhibice je inhibice nekompetitivní. Pro tento typ inhibice platí, že inhibitor se může vázat buď na vazebné místo volného enzymu nebo na komplex enzym-substrát. Enzym má dvě různá vazebná místa, jedno pro substrát a jedno pro inhibitor. Pokud se na volný enzym naváže nejprve inhibitor, dojde k narušení schopnosti enzymu vázat a přeměňovat substrát. Rychlost reakce, kdy dochází k navázání substrátu na komplex enzym-inhibitor, je oproti ostatním velmi malá, proto ji uvažovat nebudeme. Schéma této reakce vypadá takto:



Soustava diferenciálních rovnic, z nichž každá popisuje změnu množství za jednotku času pro každou z reagujících látek při nekompetitivní inhibici, je následující:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[S]}{dt} &= -k_1[S][E] + k_{-1}[ES], \\
 \frac{d[E]}{dt} &= -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-3}[EI] - k_3[E][I], \\
 \frac{d[ES]}{dt} &= k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-4}[ESI] - k_4[EI], \\
 \frac{d[P]}{dt} &= k_2[ES], \\
 \frac{d[I]}{dt} &= k_{-3}[EI] - k_3[E][I] + k_{-4}[ESI] - k_4[EI], \\
 \frac{d[EI]}{dt} &= k_3[E][I] - k_{-3}[EI], \\
 \frac{d[ESI]}{dt} &= k_4[ES][I] - k_{-4}[ESI].
 \end{aligned} \tag{2.49}$$

Soustavu upravíme podle algoritmu, který jsme použili v předchozí části této kapitoly pro odvození rychlosti základní enzymatické reakce. Získáme vzorec pro rychlost reakce, která je ne-



Obrázek 2.6: Kinetika enzymatické reakce v grafickém znázornění dle Lineweavera a Burka bez inhibitoru $[I] = 0$ (červená) a s nekompetitivním inhibitorem $[I] > 0$ (modrá).

kompetitivně inhibována [14]:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{i(EI)}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{i(ESI)}} \right), \quad (2.50)$$

kde pro jednotlivé inhibiční konstanty platí:

$$K_{i(EI)} = \frac{[E][I]}{[EI]}, \quad K_{i(ESI)} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}, \quad (2.51)$$

kde $[X]$ značí koncentraci látky X v rovnovážném stavu systému (2.48).

Při plně nekompetitivní inhibici jsou obě konstanty totožné. Nekompetitivní inhibitor neovlivňuje hodnotu konstanty Michaelise-Mentenové K_m , ale snižuje maximální rychlost reakce V_{max} (obr. 2.6).

2.4.4 Kooperace

Při kooperaci platí, že na jednu molekulu enzymu, či komplex enzymů, se může vázat více molekul substrátu. Budeme uvažovat dimer enzymu E_2 , který má dvě aktivní místa a na který se postupně váží dvě molekuly substrátu. Uvedeme si zjednodušené reakční schéma, které má tvar:



Dílčí nasycení enzymu, které je určeno podílem koncentrace enzymu, na který je vázaný substrát, $[E_2S]$ a $[SE_2S]$, ku celkové koncentraci enzymu $[E_{2,tot}]$, potom definujeme jako:

$$Y = \frac{[E_2S] + 2[SE_2S]}{2[E_{2,tot}]} = \frac{[E_2S] + 2[SE_2S]}{2[E_2] + 2[E_2S] + 2[SE_2S]}. \quad (2.53)$$

Typ kooperace závisí na vztahu mezi konstantami k_1 a k_2 . Pokud $k_1 > k_2$, jedná se o negativní kooperaci, neboť již navázaná molekula substrátu na enzymu zpomaluje reakci s další molekulou substrátu. Další možností je, že platí $k_1 \cong k_2$, tedy že navázání druhé molekuly substrátu probíhá obdobně rychle, jako se navazovala první molekula. Tato kooperace se nazývá neutrální nebo též nulová. My budeme dále uvažovat případ pozitivní kooperace, tedy že již navázaná molekula substrátu usnadňuje navázání druhé molekuly substrátu na enzym. Budeme předpokládat $k_1 \ll k_2$. Reakční schéma (2.52) pak můžeme zjednodušit na tvar:



Definujeme-li vazebnou konstantu jako

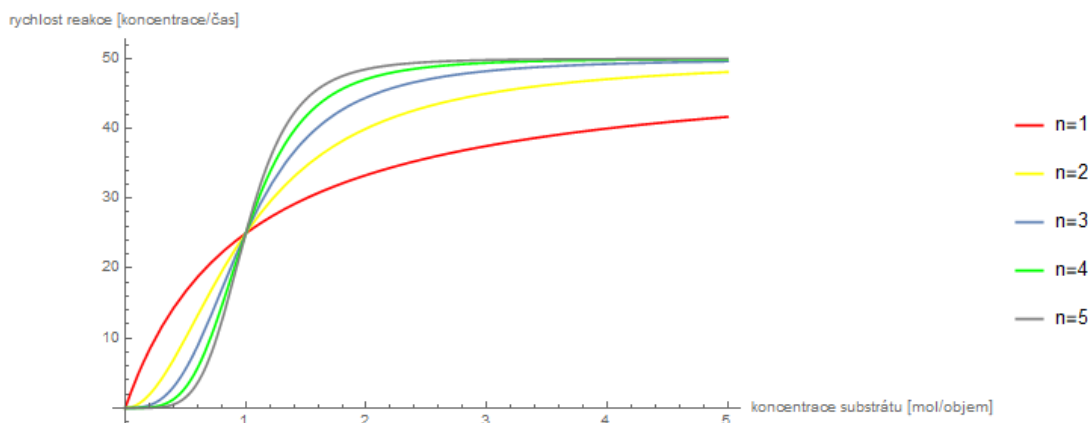
$$K = \frac{[SE_2S]}{[E_2][S]^2} \quad (2.55)$$

můžeme pro dílčí nasycení enzymu psát:

$$Y = \frac{2[SE_2S]}{2[E_{2,tot}]} = \frac{[SE_2S]}{[E_2] + [SE_2S]} = \frac{K[S]^2}{1 + K[S]^2}. \quad (2.56)$$

Rychlost takové reakce je pak dána vztahem [11]

$$v = V_{max}Y = \frac{V_{max}K[S]^2}{1 + K[S]^2}, \quad (2.57)$$



Obrázek 2.7: Vliv velikosti Hillova koeficientu na tvar křivky závislosti rychlosti reakce na počáteční koncentraci substrátu $[S]$ pro různé hodnoty n a pro $V_{max} = 50$ a $K = 1$.

což je sigmoidální (zpočátku konvexní, potom konkávní) funkce v proměnné $[S]$ (obr. 2.7).

Enzymový komplex může mít obecně n vazebných míst. Pro rychlost takové reakce pak platí:

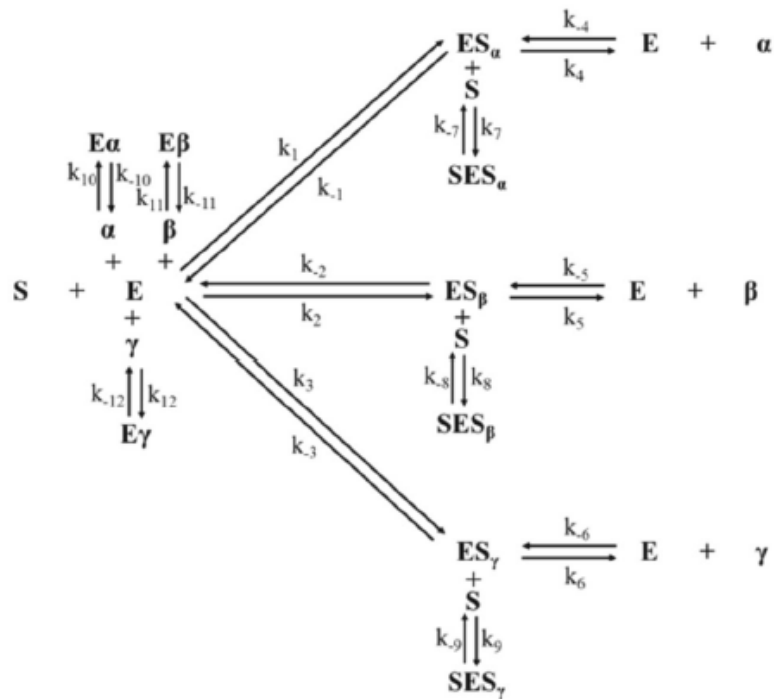
$$v = \frac{V_{max}K[S]^n}{1 + K[S]^n}, \quad (2.58)$$

což je obecný tvar tzv. Hillovy rovnice, která popisuje kooperaci. Položením rychlosti reakce $v = V_{max}Y$ proti koncentraci substrátu $[S]$ získáme sigmoidální křivku. Parametr n je také nazýván Hillovým koeficientem. Vidíme, že čím více vazebných míst enzym poskytuje, tím je pro $[S] > K$ rychlost reakce vyšší (obr. 2.7).

2.5 Aktuální výzkum v oblasti kinetiky enzymatických reakcí

Ačkoli byla základní teorie enzymatických reakcí představena už před desítkami let, modely představené v této kapitole stále tvoří základ současného teoretického i praktického výzkumu. Podívejme se na dvě studie z posledních let.

První aktuální studie, na kterou se podíváme, se zabývá kinetikou produkce cyklodextrinu katalyzované enzymem Toruzymem a glukonotransferázou z kmene *Bacillus firmus*. My si představíme pouze nástin daného výzkumu, více se čtenář dozví ve studii [18]. Autoři této studie



Obrázek 2.8: Schematické znázornění kinetického modelu navrženého pro současnou produkci α -, β - a γ -cyklodextrinu. Konstanty $k_1, k_{-1}, k_4, k_{-4}, k_7, k_{-7}, k_{10}, k_{-10}$ se vztahují k produkci α -cyklodextrinu, konstanty $k_2, k_{-2}, k_5, k_{-5}, k_8, k_{-8}, k_{11}, k_{-11}$ souvisejí s produkcí β -cyklodextrinu a konstanty $k_3, k_{-3}, k_6, k_{-6}, k_9, k_{-9}, k_{12}, k_{-12}$ se vztahují k produkci γ -cyklodextrinu. Převzato z práce [18].

vyvinuli nový matematický model popisující kinetiku produkce α -, β - a γ -cyklodextrinu. Experimentálně také studovali kinetické chování enzymu Toruzyme v reakci s maltodextrinem jako substrátem v různých koncentracích a s glukanotransferázou z kmene *Bacillus firmus* v koncentraci 100 g l^{-1} .

Schéma sledované kinetiky je uvedeno na obrázku 2.8. Všimněme si, že rychlostní konstanty jsou uvažovány jak pro reakce přímé, tak pro reakce zpětné. Výsledná rychlost pro tvorbu každého z produktů (α -, β -, γ -cyklodextrin) je v práci popsána pouze pro α -cyklodextrin, pro zbylé dva typy je odvození obdobné. Podívejme se na rovnici popisující rychlost tvorby

α -cyklodextrinu:

$$V_{\alpha} = k_4[ES_{\alpha}] - k_{-4}[E][\alpha] - k_{10}[E][\alpha] + k_{-10}[E\alpha], \quad (2.59)$$

kde $[ES_{\alpha}]$ značí koncentraci daného komplexu, $[E]$ představuje koncentraci enzymu a $[\alpha]$ je koncentrace α -cyklodextrinu. $[E\alpha]$ vyjadřuje koncentraci komplexu enzym- α -cyklodextrin a k_x jsou rychlostní konstanty jednotlivých reakcí. Autoři uvažovali hypotézu kvazi-rovnovážného stavu a různými úpravami a odvozeními, které zde uvádět nebudeme a které si čtenář může prohlédnout v uvedeném článku, získali autoři výslednou rovnici pro rychlost (vztah (21) v práci [18]).

Následně autoři prokládali řešení popsaného modelu experimentálně získanými daty a odhadovali tak modelové parametry. Příklady dat a výsledků prokládání řešeními modelu těmito daty ukazuje obrázek 2.9.

Podívejme se, jak daná studie využívá teoretické poznatky popsané v této kapitole. Pro určení rychlosti sledované reakce vycházejí autoři ze soustavy diferenciálních rovnic popisujících změnu koncentrace jednotlivých látek vyskytujících se v reakci za jednotku času. Stejně jako my uvažují celkové množství enzymu konstantní. Podobnost vidíme i mezi rovnicemi (2.12) a rovnicí (21) ve studii [18], kde se námi odvozený vztah pro rychlost enzymatické reakce zkomplikoval o členy vztahující se k jednotlivým typům cyklodextrinu.

Dále se podíváme na studii [20]. Autoři se zde věnují matematickému modelování kinetiky současného cukernatění a fermentace celulózy na etanol. Cílem studie bylo stanovit klíčové reakční parametry, které by byly použitelné pro širokou škálu reakčních podmínek. Během studie byly provedeny pokusy s různým enzymovým zatížením (10, 15 a 20 FPU/g celulózy) a různými počátečními koncentracemi fermentovatelných cukrů (glukóza a manóza). Jako výchozí látka této přeměny často slouží lingocelulózová biomasa, která vzniká jako vedlejší produkt v zemědělství či lesnictví. Lingocelulózová látka má velmi složitou strukturu, přeměna tedy neprobíhá přímo, ale přes čtyři kroky. Nejprve dochází k předběžnému uvolnění polymerních řetězců celulózy a hemicelulózy, následně k jejich enzymatické hydrolýze. Dalším krokem je zkvašení takto získaných monomerních cukrů a posledním krokem je vznik etanolu a jeho dehydratace. Podrobnější popis přeměny, stejně jako podmínky, za kterých probíhá, se může čtenář dozvědět v

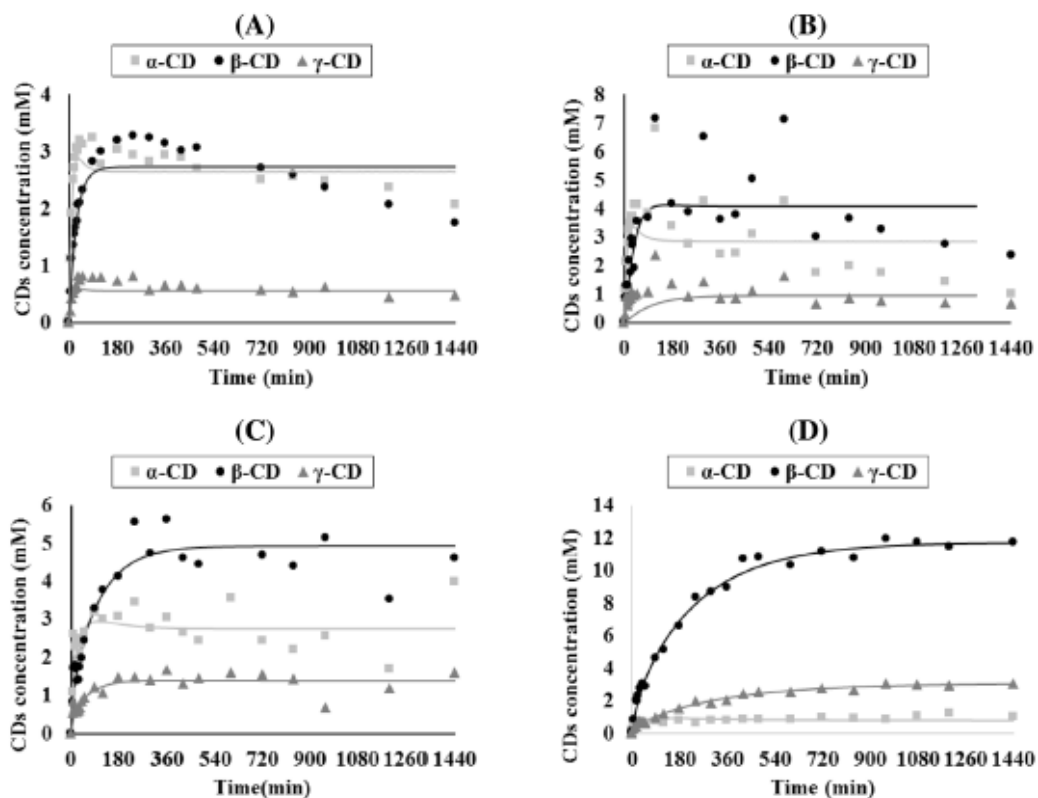
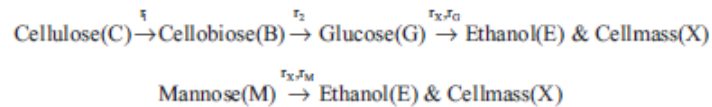


Fig. 3 Modelling of α -, β - and γ -CD production for 24 h of each enzyme under the process conditions. a Toruzyme[®] = 0.1% (v/v), CM = 20 g L⁻¹. b Toruzyme[®] = 0.1% (v/v), CM = 30 g L⁻¹.

c Toruzyme[®] = 0.1% (v/v), CM = 50 g L⁻¹. d CGTase from *Bacillus firmus* strain 37 = 1.5% (v/v), CM = 100 g L⁻¹

Obrázek 2.9: Ukázka dat a prokládání řešení kinetického modelu navrženého pro současnou produkci α -, β -, γ -cyklodextrinu těmito daty. Převzato z práce [18].



Obrázek 2.10: Reakční schéma přeměny na cukr a následného zkvašení. Převzato z práce [20].

příslušné studii [20].

Autoři odvodili kinetický model popisované chemické reakce, jejichž schéma je načrtnuto na obrázku 2.10. Popisují rychlosti jednotlivých přeměn, jako příklad si uvedeme takovou rovnici pro buněčnou hmotu:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m[X] \left(\frac{[G] + [M]}{K_G + [G] + [M]} \right) \left(\frac{K_E}{K_E + [E]} \right), \quad (2.60)$$

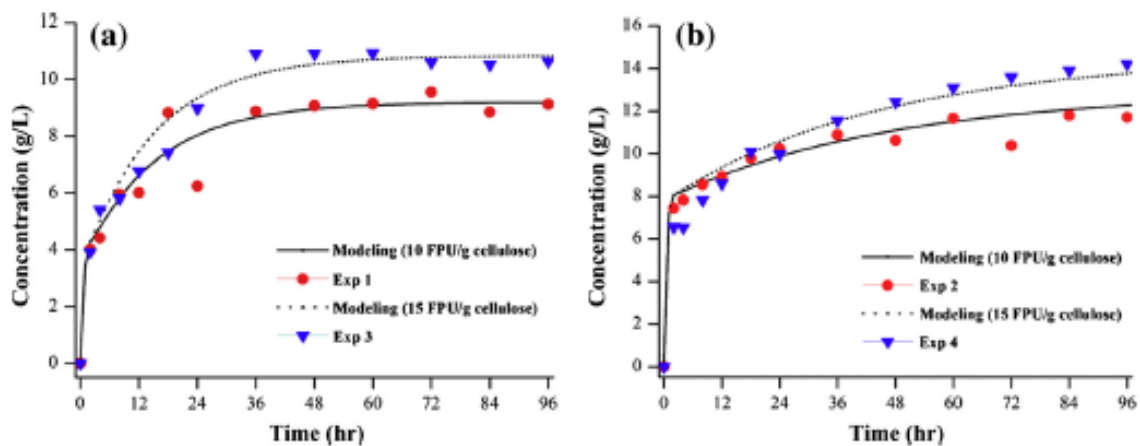
kde $[X]$ značí koncentraci látky X , μ_m představuje maximální rychlost růstu mikroorganismů, K_G je saturační konstanta glukózy pro mikroorganismus, obdobně K_E je inhibiční konstanta etanolu pro mikroorganismus. Specifickou rychlost hydrolýzy celulózy na celobiózu k'_1 definují autoři jako

$$k'_1 = \frac{k_1[ENZYM]}{K_{eq} + [ENZYM]}, \quad (2.61)$$

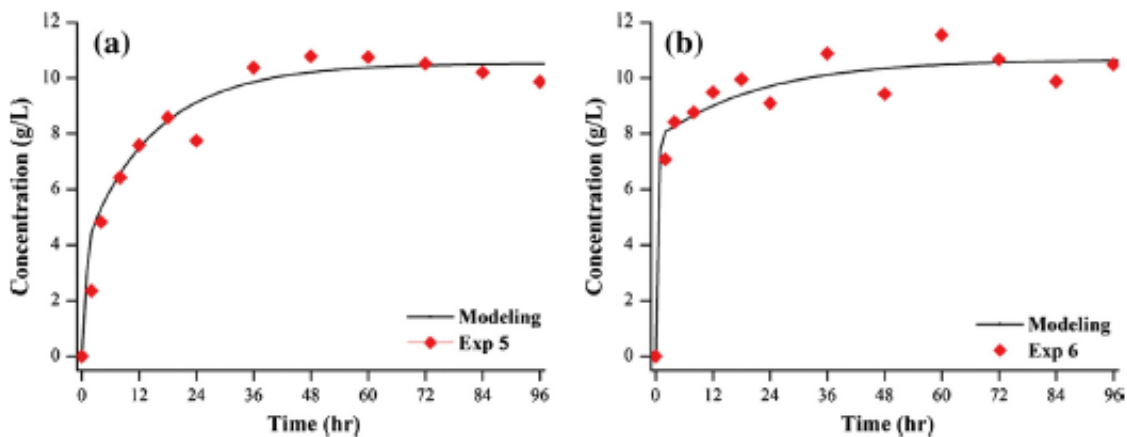
kde je K_{eq} celulázová adsorpční saturační konstanta. Na základě těchto rovnic vytvořili autoři soustavu diferenciálních rovnic popisující změnu koncentrací jednotlivých látek, které se reakcí účastní.

Po sestavení modelu opět následovalo prokládání jeho řešením daty, které je téměř nedílnou součástí každé tvorby nového matematického modelu (obr. 2.11). Autoři získali sadu parametrů, které mohou popisovat jiné probíhající procesy (obr. 2.12) a které mohou být užity v dalších (teoretických) studiích.

Studie také ukázala, že při různém zatížení a různých počátečních koncentracích cukru dochází k odlišnému mechanismu inhibice procesu cukernatění a kvašení. Autoři zjistili, že inhibiční efekt celobiózy a celulózy je významný při vysokém enzymovém zatížení a nízkých počátečních koncentracích cukrů. Dále studie ukázala, že počáteční koncentrace cukrů výrazně ovlivňuje rychlost reakce a hodnoty rychlostních konstant. Největší výtěžnost etanolu byla při



Obrázek 2.11: Koncentrace etanolu získané experimentálně a matematickým modelem pro různé počáteční koncentrace cukrů: (a) glukóza 5g/l, manóza 4.5 g/l (b) glukóza 10 g/l, manóza 9 g/l. Převzato z práce práce [20].



Obrázek 2.12: Srovnání predikce modelu a experimentálně určené koncentrace etanolu při zatížení enzymů 20 FPU/g celulózy. Převzato z práce práce [20].

vyšší počáteční koncentraci cukrů a při středním zatížení enzymu.

Ačkoli rychlosti chemických reakcí definované v této studii jsou na první pohled komplikované, vycházejí ze vztahů definovaný na začátku této kapitoly. Pro sestavení soustavy diferenciálních rovnic využívají autoři nám již známou rovnici Michaelise-Mentenové (2.12).

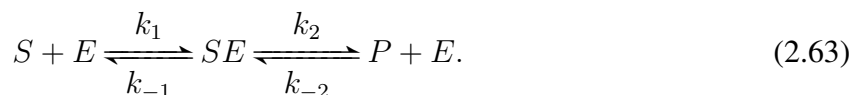
Uvedené modely obsahují řadu parametrů. Některé z nich autoři odhadli pomocí specifických experimentů, zbývající pak odhadovali z modelových situací tak, aby minimalizovali součet čtverců rozdílů naměřených a predikovaných dat. Minimalizovali tak funkci:

$$F(p) = \sum_{k=1}^n (data(k) - model(k, p))^2, \quad (2.62)$$

kde p je vektor odhadovaných parametrů a k je časová proměnná zaručující porovnání naměřených a predikovaných hodnot ve stejný časový okamžik. Takovéto výpočty se zpravidla provádějí pomocí různých matematických softwarů. Jedním z nich je MATLAB, kdy pro tento výpočet autoři použili proceduru "fmincore". [20]

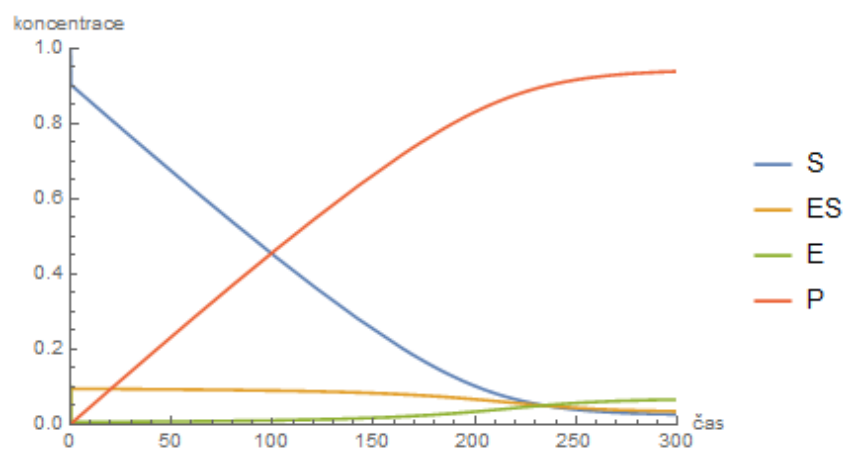
2.6 Rozpad produktu v základní enzymatické reakci

V obecné enzymatické reakci je třeba uvažovat zvratnost obou dílčích reakcí, schéma je pak následující:



Příslušné rovnice takového systému pak jsou:

$$\begin{aligned} \frac{d[S]}{dt} &= -k_1[E][S] + k_{-1}[ES], \\ \frac{d[E]}{dt} &= -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_2)[ES] - k_{-2}[P][E], \\ \frac{d[ES]}{dt} &= k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-2}[P][E], \\ \frac{d[P]}{dt} &= k_2[ES] - k_{-2}[P][E]. \end{aligned} \quad (2.64)$$



Obrázek 2.13: Numericky vypočtené průběhy koncentrací substrátu, produktu, enzymu a komplexu enzym-substrát pro rychlostí konstanty $k_1 = e^3$, $k_{-1} = 1$, $k_2 = 0.05$, $k_{-2} = \frac{k_2}{2}$ a pro počáteční podmínky $[S](0) = 1 \text{ mol/objem}$ a $[E](0) = 0.1 \text{ mol/objem}$.

Kapitola 3

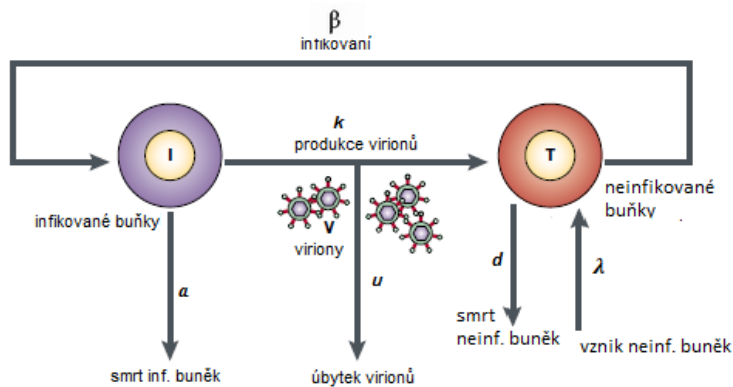
Modelování virových infekcí

Třetí kapitola mé diplomové práce je věnovaná matematickým modelům, které popisují dynamiku virové infekce z hlediska dějů probíhajících na buněčné úrovni. V práci se zabývám popisem infekce HIV a chřipky. Pro každou z těchto infekcí uvádím základní model, ze kterého vycházejí různá rozšíření. Některá rozšíření uvádím podrobněji, jiná pouze zmíním. V části kapitoly věnované modelování HIV infekce jsem čerpala z prací [13, 16]. Pro část věnovanou modelování infekce chřipky jsem využila práci [1]. Na závěr kapitoly představím dvě aktuální studie v oblasti modelování dynamiky virových infekcí na buněčné úrovni.

3.1 HIV

HIV (Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti) je virus napadající T-lymfocyty, které jsou odpovědné za řízení imunitní odpovědi. První nákazy člověka tímto onemocněním se datují na počátek 20. století. Jedná se o nemoc, která je rozšířena všude po světě. Proto se také vědci začali zabývat jejím modelováním. Podívejme se, jak takový základní model může vypadat.

Pro základní model uvažujme dva typy buněk, a sice buňky infikované I (infected cells) a buňky neinfikované náchylné k infekci T (target cells). Třetí složkou modelu jsou pak viriony V . Většina buněk má schopnost buněčného dělení, takže neinfikované buňky neustále vznikají,



Obrázek 3.1: Základní model virové infekce HIV. Upraveno podle [16].

a to s konstantní rychlostí λ , umírají s rychlostí d a stávají se infikovanými s rychlostí β . Se stejnou rychlostí tedy přibývají buňky infikované, které umírají s rychlostí a . Infikované buňky uvolňují viriony s rychlostí k a viriony se rozpadají s rychlostí u . Popsané děje můžeme zobrazit graficky (obr. 3.1) nebo zapsat pomocí soustavy tří diferenciálních rovnic jako rychlost změny množství jednotlivých složek systému. Množství zdravých a infikovaných buněk vyjadřujeme jako jejich počet, zatímco množství virionů vyjadřujeme pomocí jednotky $\text{TCID}_{50}/\text{objem}$. Jedná se o objemovou dávku viru, která zabije všechny buňky v polovině tkáňových kultur.

$$\begin{aligned} \frac{dT}{dt} &= \lambda - dT - \beta VT, \\ \frac{dI}{dt} &= \beta VT - aI, \\ \frac{dV}{dt} &= kI - uV. \end{aligned} \tag{3.1}$$

Podívejme se na analýzu systému (3.1). Rádi bychom mimo jiné zjistili podmínky, kdy se bude infekce šířit, a kdy nikoli. Potřebujeme tedy vyšetřit stabilitu ekvilibrí této soustavy v případě, že se v systému nenachází infekce. Podmínka na nestabilitu tohoto ekvilibrí pak bude odpovídat podmínce, kdy se infekce bude šířit. Nejprve určíme všechna ekvilibrí tohoto systému

(viz příloha č. 1), systém má dvě ekvilibrria. Jedním je

$$\begin{aligned} T_1^* &= \frac{au}{k\beta}, \\ I_1^* &= \frac{\lambda}{a} - \frac{du}{k\beta}, \\ V_1^* &= \frac{\lambda k}{au} - \frac{d}{\beta}. \end{aligned} \quad (3.2)$$

Toto ekvilibrrium je biologicky relevantní pokud jsou všechny jeho složky kladné, což nastává, když $\frac{k\beta\lambda}{adu} > 1$. Nazývá se endemické ekvilibrrium.

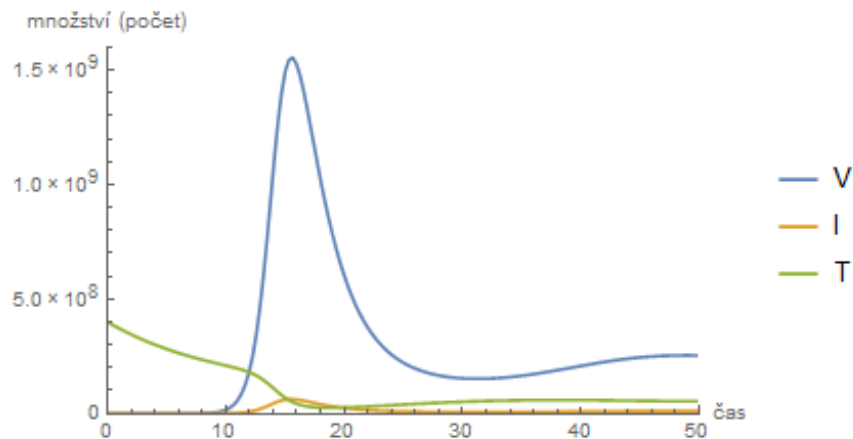
Druhé ekvilibrrium systému (3.1) je

$$\begin{aligned} T_2^* &= \frac{\lambda}{d}, \\ I_2^* &= 0, \\ V_2^* &= 0. \end{aligned} \quad (3.3)$$

Toto ekvilibrrium je ekvilibrrium bez infekce. Vyšetřováním jeho stability (viz příloha č. 2) se ukázalo, že ekvilibrrium (3.3) je nestabilní právě když $\frac{k\beta\lambda}{adu} > 1$. Všimněme si, že to je zároveň podmínka ne existenci endemického ekvilibrria (3.2). Číslo

$$R_0 = \frac{\beta\lambda k}{adu}. \quad (3.4)$$

se nazývá základní reprodukční číslo infekce. Jedná se o číslo, které určuje počet infikovaných buněk vzniklých z jedné infikované buňky. Pokud je $R_0 < 1$, znamená to, že každá infikovaná buňka produkuje v průměru méně než jednu nově infikovanou buňku. Tím pádem se infekce nešíří a ekvilibrrium (3.3) je stabilní. Pokud bude naopak platit $R_0 > 1$, pak každá infikovaná buňka vytváří průměrně více jak jednu nově infikovanou buňku. Infekce se tedy šíří, což znamená, že roste počet infikovaných buněk a zároveň klesá počet těch neinfikovaných. Se zmenšujícím se počtem neinfikovaných buněk klesá i možnost virionů infikovat je. Systém konverguje k rovnovážnému stavu (3.2) [13] (obr. 3.2), neboť ten je za podmínky $R_0 > 1$ stabilní. V tomto stavu každá infikovaná buňka produkuje v průměru jednu nově infikovanou buňku. Nastává stav dlouhodobé či trvalé infekce.



Obrázek 3.2: Numericky spočtené průběhy množství neinfikovaných buněk T , infikovaných buněk I a virionů V podle soustavy (3.1) pro parametry uvedené v tabulce 3.1.

Než se podíváme na nějaká rozšíření modelu (3.1), ukážeme si graf jeho numerického řešení (obr. 3.2). Vidíme, že množství zdravých buněk nejprve klesá a poté se ustaluje v ekvilibriu. Množství infikovaných buněk se stejně tak jako množství zdravých buněk dostává po určité době do ekvilibria. Křivka zobrazující změny v populaci virionů nabývá (pro zvolené parametry) přibližně 18. den infekce maxima a poté klesá do ekvilibria.

3.1.1 Rozšíření základního modelu HIV infekce

Buněčná imunitní odpověď

Nejprve budeme uvažovat buněčnou imunitní odpověď organismu. Při buněčné imunitní odpovědi jsou v organismu přítomné cytotoxické T-lymfocyty Z , které dokáží rozpoznat infikované buňky a pomocí vylučovaných látek je likvidují. Základní model popsany soustavou (3.1) dopl-

níme o rovnici popisující činnost těchto lymfocytů a získáme soustavu čtyř rovnic [13]:

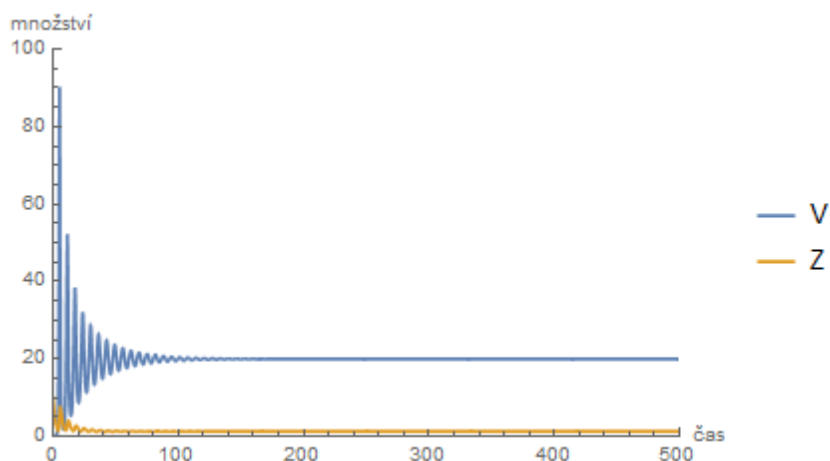
$$\begin{aligned}
 \frac{dT}{dt} &= \lambda - dT - \beta VT, \\
 \frac{dI}{dt} &= \beta VT - aI - pIZ, \\
 \frac{dV}{dt} &= kI - uV, \\
 \frac{dZ}{dt} &= cIZ - bZ,
 \end{aligned}
 \tag{3.5}$$

kde c značí rychlost množení lymfocytů (všimněme si, že lymfocyty vznikají pouze za přítomnosti infikovaných buněk) a b udává, jak rychle se lymfocyty rozkládají při nedostatku infikovaných buněk. Rychlost, s jakou T-lymfocyty zabíjejí infikované buňky, je dána parametrem p .

Aby se v organismu vyvolala buněčná imunitní odpověď a množství cytotoxických T-lymfocytů se zvyšovalo, musí být v organismu přítomno minimální množství infikovaných buněk tak, aby platilo $cI > b$. Pokud bude platit $cI^* < b$, kde I^* je definováno v (3.2), cytotoxické T-lymfocyty budou aktivované pouze po přechodnou dobu a systém konverguje k ekvilibriu danému vztahy (3.2). Pro případ, kdy platí $cI^* > b$, systém vykazuje tlumené oscilace k ekvilibriu danému rovnicemi [13]:

$$\begin{aligned}
 T^{**} &= \frac{\lambda cu}{cdu + \beta bk}, \\
 I^{**} &= \frac{b}{c}, \\
 V^{**} &= \frac{bk}{cu}, \\
 Z^{**} &= \frac{1}{p} \left(\frac{\lambda \beta ck}{cdu + \beta bk} - a \right).
 \end{aligned}
 \tag{3.6}$$

Toto ekvilibrium opět určíme tak, že pravé strany rovnic (3.5) položíme rovny nule a vyřešíme výslednou soustavu algebraických rovnic vzhledem ke stavovým proměnným T, I, V a Z . Všimněme si, že množství infikovaných buněk v ekvilibriu závisí pouze na parametrech b a c , které popisují rychlost množení a rozpadu T-lymfocytů. Dále platí $T^* < T^{**}, I^* > I^{**}$ a $V^* > V^{**}$, což znamená, že pokud jsou přítomny cytotoxické T-lymfocyty, snižuje se virová zátěž a stoupá počet neinfikovaných buněk. Ale o celkovém množství buněk, $T^* + I^*$, nemůžeme v porovnání s hodnotou $T^{**} + I^{**}$ říci nic obecného.



Obrázek 3.3: Numericky spočtené průběhy množství virionů V a cytotoxických T-lymfocytů Z podle soustavy (3.5) pro parametry uvedené v tabulce 3.1.

Pokud by čtenáře zajímaly různé odlišnosti v buněčné imunitní odpovědi či další rozšíření tohoto modelu, může nahlédnout do studie [13].

Numericky spočtené řešení modelu (3.5) je zobrazeno na obrázku 3.3. Množství virionů v přítomnosti cytotoxických T-lymfocytů se výrazně mění, osciluje, po určitém čase se systém dostává do ekvilibria. To můžeme vidět i v případě křivky znázorňující změny v populaci T-lymfocytů Z .

Přítomnost léčiv

Viděli jsme, jakým způsobem se model změní, pokud budeme uvažovat buněčnou imunitní odpověď. Nyní se stručně podíváme na to, jak se v základním modelu (3.1) projeví přítomnost antiretrovirových léčiv. Na buněčné úrovni po podání léčiv dochází díky inhibitorům reverzní transkriptázy RT k blokování schopnosti HIV infikovat buňku a díky inhibitorům proteázy PI k produkci neinfekčních virionů V_{NI} . Pokud tedy uvažujeme přítomnost těchto léčiv, získáme

následující model [16]:

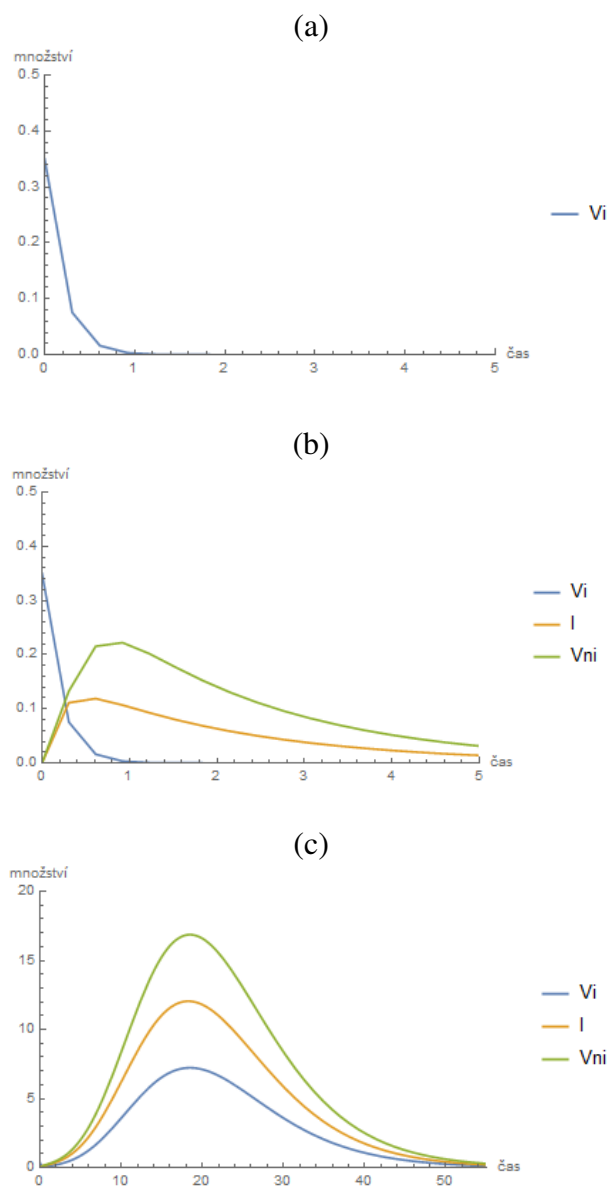
$$\begin{aligned}
 \frac{dT}{dt} &= \lambda - dT - (1 - \epsilon_{RT})\beta V_I T, \\
 \frac{dI}{dt} &= (1 - \epsilon_{RT})\beta V_I T - aI, \\
 \frac{dV_I}{dt} &= (1 - \epsilon_{PI})kI - uV_I, \\
 \frac{dV_{NI}}{dt} &= \epsilon_{PI}kI - uV_{NI}.
 \end{aligned}
 \tag{3.7}$$

Členy ϵ_{RT} a ϵ_{PI} udávají účinnosti reverzní transkriptázy a inhibitorů proteázy. Čím vyšší hodnotu má dané ϵ , tím jsou léky účinnější ($\epsilon = 1$ znamená 100% účinnost). Proměnná V_I značí množství virionů, které jsou schopné buňku infikovat a V_{NI} množství virionů, které tuto schopnost nemají.

Pokud by účinek inhibitorů proteázy byl stoprocentní ($\epsilon_{PI} = 1$) a počet neinfikovaných buněk T by zůstával neměnný, pro celkové množství viru V v organismu by platilo (výpočet viz příloha č. 3):

$$V(t) = V_I + V_{NI} = e^{-ut}(V_{I_0} + V_{NI_0}) + e^{-ut}kt \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} + \left(I_0 - \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} \right) \left(\frac{k(e^{-at} - e^{-ut})}{u - a} \right).
 \tag{3.8}$$

Podrobnější analýzu tohoto systému v práci uvádět nebudeme. Je samozřejmé, že léky ovlivní jednotlivé hodnoty v ekvilibriu. Množství infikovaných buněk i virionů poklesne oproti (3.2) a naopak množství neinfikovaných buněk bude větší. Podívejme se tedy alespoň na numericky spočtené řešení (obr. 3.4). Jak jsme již psali výše, funkčnost léků při HIV infekci udáváme pomocí dvou faktorů, účinnosti reverzní transkriptázy a inhibitorů proteázy. Pokud je účinnost v obou případech stoprocentní (obr. 3.4a), v řešení se nám vyskytuje pouze malé množství virionů, které jsou schopny infikovat buňku. Po krátké době se všechny viriony ztrácí a infekce mizí. V případě zobrazeném na obrázku 3.4b jsme uvažovali účinnost reverzní transkriptázy sedmdesátiprocentní ($\epsilon_{RT} = 0.7$) a účinnost inhibitorů proteázy stoprocentní ($\epsilon_{PI} = 1$). Vidíme, že po krátké době opět vymizí populace virionů schopných infikovat buňku a narůstá populace virionů, které tuto schopnost nemají. Tato populace také po čase vymře. Na obrázku 3.4c je vykresleno řešení systému (3.7), kdy jsou oba parametry rovny 0.7. To znamená, že jak reverzní transkriptáza tak inhibitor proteázy jsou účinné ze sedmdesáti procent. Vidíme, že v poměrně krátkém čase



Obrázek 3.4: Numericky spočtené průběhy infikovaných buněk I , virionů schopných infikovat buňky V_I a virionů neschopných infikovat buňky V_{NI} podle soustavy (3.7) pro parametry uvedené v tabulce 3.1 a pro hodnoty účinnosti reverzní transkriptázy a inhibitorů proteázy $\epsilon_{RT} = 1, \epsilon_{PI} = 1$ (a), $\epsilon_{RT} = 0.7, \epsilon_{PI} = 1$ (b) a $\epsilon_{RT} = 0.7, \epsilon_{PI} = 0.7$ (c). Množství infikovaných buněk v panelech b, c je pro lepší viditelnost vynásobeno 50. Jednotlivé panely mají jiné škálování os.

roste velikost populací obou uvažovaných skupin virionů. Více je těch, které nemohou buňku infikovat. Obě tyto populace po čase vymírají.

Podívejme se nyní na vzájemné porovnání obrázků. Začněme s obrázky 3.4a,b. Můžeme říci, že snížení účinku reverzní transkriptázy má za následek vznik populace virionů, které nemohou infikovat buňky. V populaci virionů, které mohou buňky infikovat, nedošlo téměř k žádným změnám. V grafických řešení na obrázcích 3.4b,c, které se liší účinkem inhibitoru proteázy, je velký rozdíl. Vidíme, že v případě sedmdesátiprocentní účinnosti reverzní transkriptázy a inhibitoru proteázy (obr. 3.4c), obě populace virionů rostou a přežívají daleko déle než v případě obrázku 3.4b, kde populace virionů schopných infikovat buňku neroste, ale pouze klesá.

O léčivech a jejich šíření v buňkách se čtenář více dočte v následující kapitole, která je věnována matematickému modelování ve farmakologii.

Rozšíření základního modelu (3.1) existuje celá řada, uvedla jsem pouze rozšíření zahrnující buněčnou imunitní odpověď a přítomnost léčiv. Pokud by se čtenář chtěl o této oblasti dozvědět více, může k tomu použít například práce [13, 16, 3, 17].

Je pochopitelné, že se nemodeluje pouze HIV infekce, o několik desetiletí později se začalo pracovat i na modelování infekce chřipky. Představme si nyní základní model a opět pár rozšíření právě pro tuto infekci.

3.2 Chřipka

Během tří velkých pandemií chřipky ve 20. století podlely chřipce miliony lidí. Stejně jako HIV infekce i chřipka tedy představuje světový problém, kterému je třeba věnovat pozornost. Základní principy virové kontroly během nekomplikované infekce virem chřipky nejsou stále plně pochopeny. Nicméně základní model byl odvozen a v současnosti se pracuje na jeho dalších zdokonaleních. My si, stejně jako v předchozí části kapitoly, nejprve představíme základní model a pak se opět podíváme na některá jeho rozšíření.

Mezi základními modely HIV infekce a infekce chřipky existuje určitá podobnost. I zde uvažujeme buňky neinfikované T , infikované I a viriony V . Neinfikovaná buňka se stane infikovanou s rychlostí β . Infikované buňky produkují viriony s průměrnou rychlostí k a umírají s rychlostí

Parametr	Význam	Hodnota	Jednotka
λ	rychlost vzniku neinfikovaných buněk	10^7	čas^{-1}
d	rychlost zániku neinfikovaných buněk	0.1	čas^{-1}
β	rychlost infekce	$3.75 \cdot 10^{-10}$	$(\text{TCID}_{50}/\text{objem})^{-1}\text{čas}^{-1}$
a	rychlost zániku infikovaných buněk	0.5	čas^{-1}
k	rychlost vzniku virionů	500	$(\text{TCID}_{50}/\text{objem})\text{čas}^{-1}$
u	rychlost zániku virionů	20	čas^{-1}
p	rychlost zániku infikovaných buněk působením T-lymfocytů	2.5	čas^{-1}
c	rychlost vzniku T-lymfocytů	2.5	čas^{-1}
b	rychlost zániku T-lymfocytů	0.5	čas^{-1}
ε_{RT}	účinnost reverzní transkriptázy	1; 0.7	–
ε_{PI}	účinnost inhibitorů proteázy	1; 0.7	–

Tabulka 3.1: Přehled parametrů potřebných v uvedených modelech pro infekci HIV, data převzata z [3] a [13].

a. Viriony ubývají s rychlostí u . Buněčná imunitní odpověď netvoří v základním modelu samostatnou rovnici, ale je zahrnuta v parametrech a a u . Jediný rozdíl je v první rovnici, chřipka je krátkodobé onemocnění, proto vznik a úmrtí neinfikovaných buněk (parametry λ a d) neuvažujeme. Tyto parametry se projeví pouze u dlouhodobých infekcí jako je právě HIV infekce.

Model tedy vypadá následovně:

$$\begin{aligned}\frac{dT}{dt} &= -\beta VT, \\ \frac{dI}{dt} &= \beta VT - aI, \\ \frac{dV}{dt} &= kI - uV.\end{aligned}\tag{3.9}$$

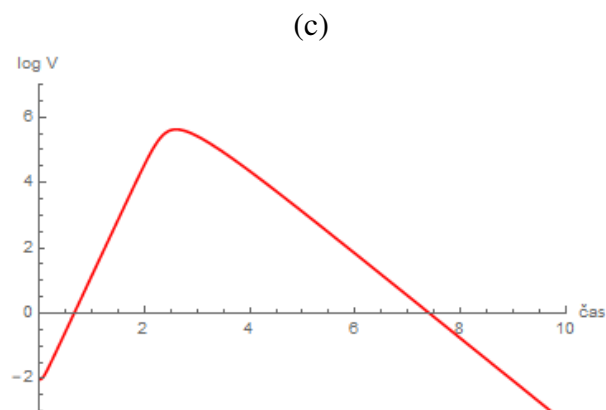
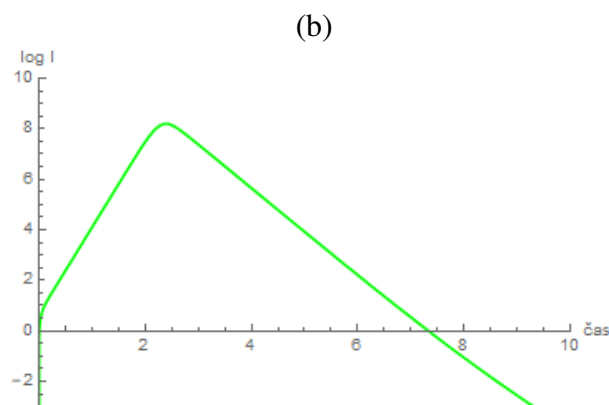
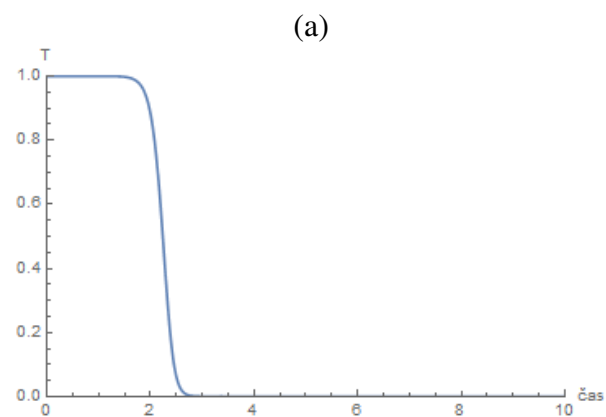
Pokud bychom chtěli spočítat ekvilibria systému (3.9), postupovali bychom stejně jako v případě HIV infekce. Ekvilibria systému (3.9) jsou $(T_1^*, I_1^*, V_1^*) = (T_0, 0, 0)$, což je ekvilibrium bez infekce, a $(T_2^*, I_2^*, V_2^*) = (T_\infty, 0, 0)$, což je ekvilibrium pro probíhající infekci.

Jediným měřitelným ukazatelem přítomnosti infekce v organismu je množství virionů, standardně se tedy řešení takovýchto systémů vykresluje právě jako časový průběh změn jejich množství (obr.3.5c), nicméně na obr. 3.5 vidíme vykresleny časové průběhy i zdravých (obr.3.5a) a infikovaných buněk (obr.3.5b).

Stejně jako v případě HIV infekce, i zde lze definovat základní reprodukční číslo infekce R_0 . Odvození je stejné jako v případě tohoto čísla pro HIV infekci, ale vzhledem k tomu, že zdravé buňky nevznikají, namísto členu $\frac{\lambda}{d}$ je tentokrát počáteční množství zdravých buněk T_0 . Toto číslo představuje průměrný počet neinfikovaných buněk, kolik buněk dokáže jedna infikovaná buňka infikovat v jinak zdravé populaci. Pokud je tedy toto číslo větší než jedna, $R_0 > 1$, pak se infekce šíří organismem. A naopak infekce brzy po objevení se mizí pokud platí $R_0 < 1$. Pro náš model (3.9) je základní reprodukční číslo infekce definováno takto:

$$R_0 = \frac{k\beta T_0}{au}.\tag{3.10}$$

POdívejme se teď na některá rozšíření základního modelu (3.9).



Obrázek 3.5: Časový průběh změn v množství zdravých buněk (a), infikovaných buněk (b) a virionů (c) během infekce popsané modelem (3.9) pro parametry uvedené v tabulce 3.2 a pro počáteční podmínky $T(0) = 4 \cdot 10^8$, $I(0) = 0$, $V(0) = 10^{-2}$.

3.2.1 Rozšíření základního modelu infekce chřipky

Doba latence

Při infekci chřipkou není možné šest až osm hodin detekovat volné viriony. Tuto prodlevu do základního modelu (3.9) zavedeme definováním dvou různých populací infikovaných buněk. Máme tedy populaci infikovaných buněk I_1 , které neprodukují volné viriony, a populaci I_2 , která představuje infikované buňky produkující viriony. Získáme následující čtyři diferenciální rovnice, popisující tuto situaci [1]:

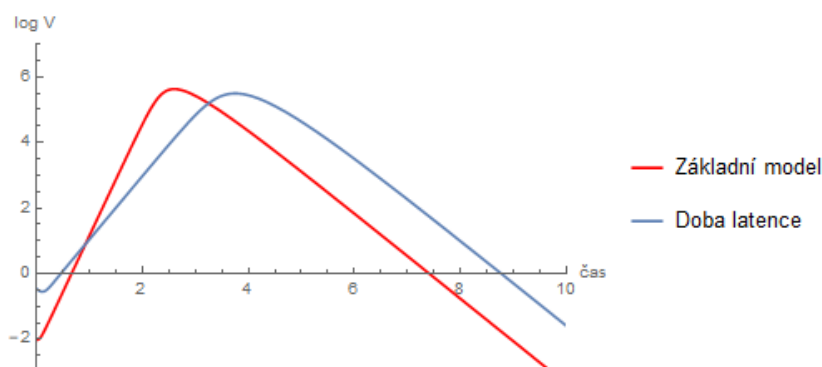
$$\begin{aligned}\frac{dT}{dt} &= -\beta VT \\ \frac{dI_1}{dt} &= \beta VT - cI_1 \\ \frac{dI_2}{dt} &= cI_1 - aI_2 \\ \frac{dV}{dt} &= kI_2 - uV,\end{aligned}\tag{3.11}$$

kde $\frac{1}{c}$ představuje průměrnou dobu, než se buňky, které neprodukují viriony, změní na buňky, které je naopak produkují. Rozdělení infikovaných buněk na dvě populace způsobuje, že model je více realistický, neboť pokud se podíváme na životní cyklus virionů, je zpoždění v jejich produkci v době počáteční infekce jeho součástí.

Obrázek 3.6 představuje křivku časového průběhu změn v množství virionů v těle po dobu 10 dní od nákazy. V obrázku jsou zakresleny tyto křivky jak pro základní model (3.9), tak pro model uvažující časovou prodlevu v produkci volných virionů (3.11). Vidíme, že populace virionů popsaná rozšířeným modelem nabývá svého maxima přibližně o dva dny později než je tomu u populace popsané základním modelem. Dále si můžeme všimnout, že viriony zůstávají v organismu přibližně o jeden a půl dne déle.

Protivirová obrana organismu

Jako další příklad, jak základní model (3.9) rozšířit, si uvedeme model, kde budeme uvažovat přítomnost interferonů a jejich působení na buňky. Interferony jsou proteiny nespecifické imunity, které se podílejí na protivirové obraně organismu. K modelu přibudou dvě rovnice, jedna popisující změnu množství interferonů F v čase a druhá změnu počtu buněk R odolných vůči infekci, které vzniknou působením interferonů na neinfikované buňky T . Získáme tedy model



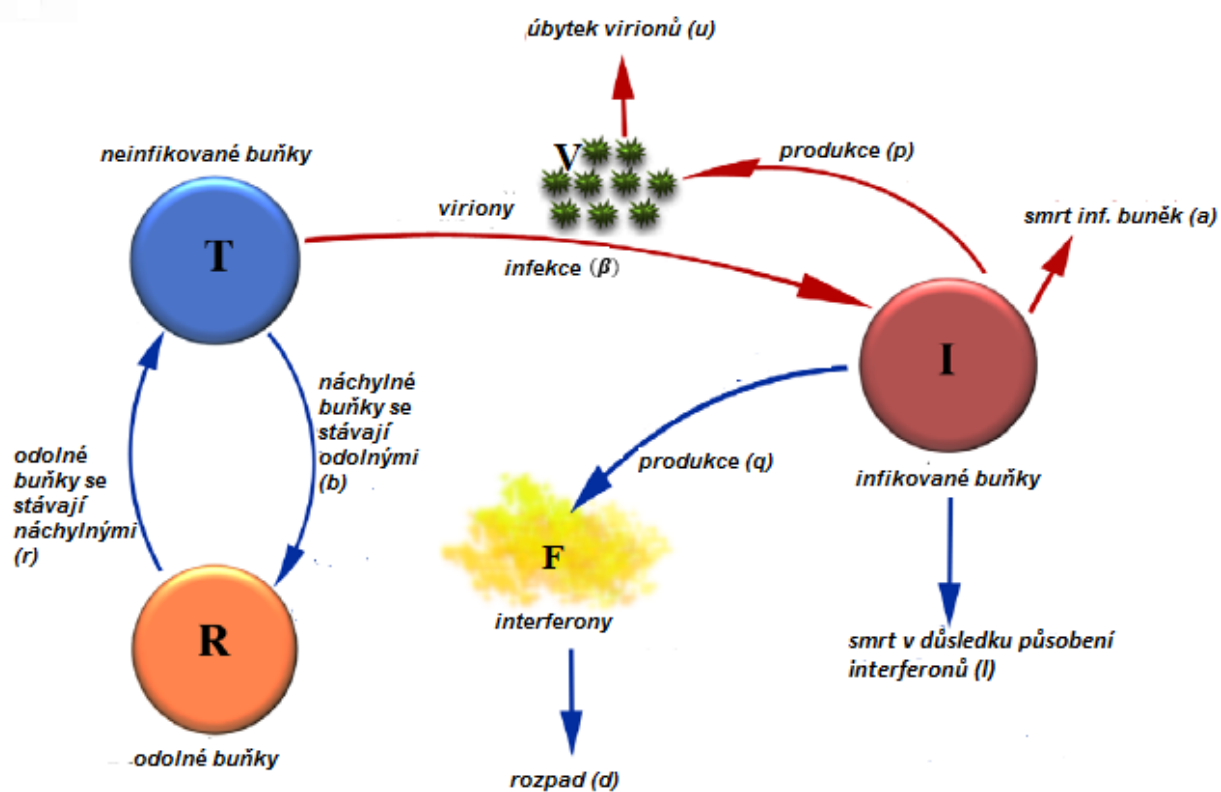
Obrázek 3.6: Časový průběh změn v množství virionů během nákazy popsané modelem (3.9) (červená) a modelem (3.11) (modrá) pro parametry uvedené v tabulce 3.2.

[15]:

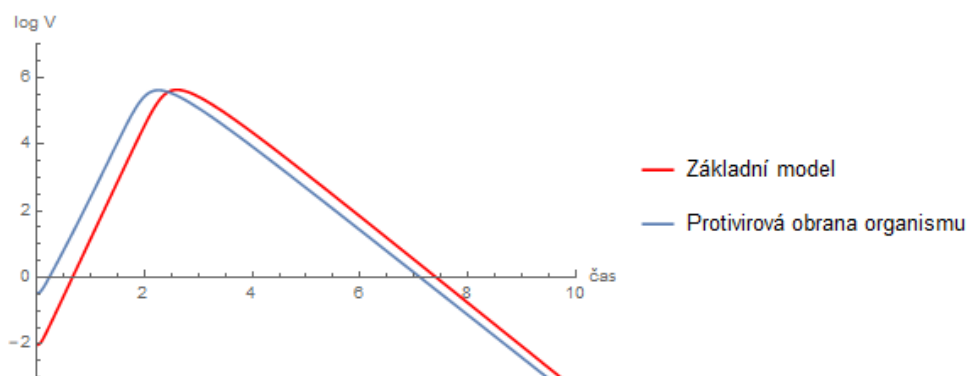
$$\begin{aligned}
 \frac{dT}{dt} &= -\beta VT - bFT + rR, \\
 \frac{dI}{dt} &= \beta VT - aI - lIF, \\
 \frac{dR}{dt} &= bFT - rR, \\
 \frac{dV}{dt} &= kI - uV, \\
 \frac{dF}{dt} &= qI - dF.
 \end{aligned}
 \tag{3.12}$$

První z rovnic popisuje změny v populaci neinfikovaných buněk T . S rychlostí b se neinfikované buňky stanou odolné vůči infekci a naopak parametr r reprezentuje rychlost, s jakou se odolné buňky stanou opět náchylné na působení virionů. Druhá rovnice je pro množství infikovaných buněk I , jediným novým parametrem v této rovnici je l vyjadřující rychlost umírání infikovaných buněk v důsledku působení interferonů. R značí buňky, které jsou rezistentní vůči virionům, třetí rovnice tedy popisuje změny v jejich populaci. Čtvrtou rovnicí modelu (3.12) je rovnice pro populaci virionů, kterou již známe z předchozích modelů. Poslední rovnice popisuje populaci interferonů F . Interferony jsou sekretovány infikovanými buňkami s rychlostí q a s rychlostí d se rozpadají. Popsané děje jsou zobrazeny také na obrázku 3.7.

Vzhledem k množství rovnic tohoto modelu zde nebudeme uvádět jeho analýzu. Stejně jako



Obrázek 3.7: Rozšíření základního modelu infekce chřiky o přítomnost a působení interferonů. Upraveno podle [15].



Obrázek 3.8: Časový průběh změn v množství virionů během nákazy popsané modelem (3.9) (červená) a modelem (3.12) (modrá) pro parametry uvedené v tabulce 3.2.

u předchozího rozšíření si porovnáme časové změny v množství virionů během nákazy (obr. 3.8). Z obrázku vidíme, že pokud dochází k protivirové obraně organismu, viriony se dříve ztrácejí z organismu oproti základnímu modelu (3.9). Pokud by se o modelu (3.12) chtěl čtenář dozvědět více, necht' nahlédne do studie [15]. Další možnosti rozšíření může čtenář nalézt například v pracích [19, 1, 2].

3.3 Aktuální výzkum v modelování virových infekcí

Jak jsme se již zmiňovali dříve, onemocnění chřipkou představuje aktuální světový problém. Stále tedy vědci pracují na zdokonalení základního modelu (3.9). Podívejme se na nyní na studii zabývající se heterogenním šířením chřipky mezi lidmi a důsledky pro epidemiologii a její kontrolu [5].

Autoři vycházejí ze základního modelu (3.9), který rozšiřují o existenci protizánětlivých cytokinů, a sice lokálních F_L a systémových F_S . Pomocí přístupu založeného na matematickém modelování se zaměřují na dynamiku šíření chřipky uvnitř hostitele a k identifikaci parametrů spojených s heterogenním přenosem infekce mezi jedinci. Aby k došlo k infikování dalšího jedince, musí infikovaný jedinec uvolnit infekční částice respiračními příznaky. Množství uvolněných virionů se liší jedinec od jedince, čímž je dána heterogenita přenosu chřipky. Podívejme se na

Parametr	Význam	Hodnota	Jednotka
β	rychlost infekce	$2.7 \cdot 10^{-5}$	$(\text{TCID}_{50}/\text{objem})^{-1}\text{čas}^{-1}$
a	rychlost zániku infikovaných buněk	4	čas^{-1}
k	rychlost vzniku virionů	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$(\text{TCID}_{50}/\text{objem})\text{čas}^{-1}$
u	rychlost zániku virionů	3	čas^{-1}
c	$\frac{1}{c}$ = doba latence	4.2	
b	rychlost, s jakou se neinfikované buňky stávají odolné vůči infekci	$3.3 \cdot 10^{-1}$	čas^{-1}
r	rychlost, s jakou se odolné buňky stávají náchylné k infekci	2.6	čas^{-1}
l	rychlost zániku infikovaných buněk působením interferonů	2.4	čas^{-1}
q	rychlost vzniku interferonů	$9.6 \cdot 10^{-10}$	čas^{-1}
d	rychlost zániku interferonů	1.9	čas^{-1}

Tabulka 3.2: Přehled parametrů potřebných v uvedených modelech pro infekci chřipky, data čerpána z prací [15] a [1].

soustavu diferenciálních rovnic, kterou autoři přinesli (schéma vidíme na obr. 3.9):

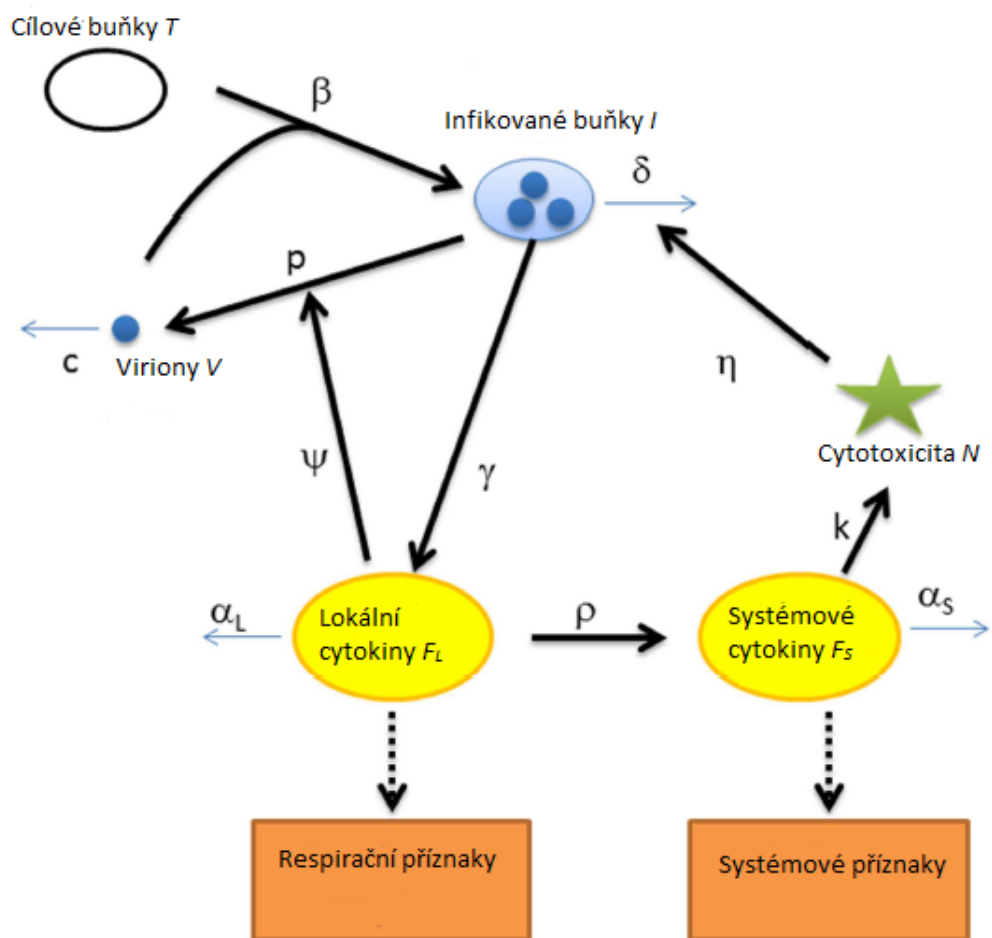
$$\begin{aligned}
 \frac{dT}{dt} &= -\beta VT, \\
 \frac{dI}{dt} &= \beta VT - \delta I - \eta IN, \\
 \frac{dV}{dt} &= \frac{p}{1 + \psi F_L} I - cV - \sigma \beta VT, \\
 \frac{dF_L}{dt} &= \gamma I - \alpha_L F_L, \\
 \frac{dF_S}{dt} &= \rho F_L - \alpha_S F_S, \\
 \frac{dN}{dt} &= k F_S.
 \end{aligned}
 \tag{3.13}$$

Soustava (3.13) říká, že volné viriony V infikují cílové buňky T s rychlostí β a umírají s rychlostí c . Infikované buňky I produkují viriony s rychlostí p , umírají s rychlostí δ a s rychlostí γ indukují produkci lokálních protizánětlivých cytokinů F_L . Ty snižují rychlost produkce virionů a to s účinností ψ , umírají s rychlostí α_L a indukují vznik systémových protizánětlivých cytokinů F_S s rychlostí ρ . Systémové prozánětlivé cytokiny se vylučují rychlostí α_S a indukují aktivaci cytotoxické aktivity N rychlostí k . Díky této aktivitě pak infikované buňky I dále umírají s rychlostí η .

Pro nalezení realistické parametrizace modelu provedli autoři prokládání řešení modelu (3.13) daty, o kterém si čtenář může přečíst v dané práci. Autoři tedy získali sadu parametrů, pro něž model popisuje skutečnou situaci. Sestavený model předpovídá, že 10,9 % a 18,2 % infikovaných jedinců je zodpovědných za 90 % a 95 % produkovaných infekčních částic. Což přidává další rozměr šíření infekce chřipky, vedle struktury populace a kontaktů s okolím.

V rámci představení další aktuální studie se podíváme na matematické modelování postko-infekce chřipkovými viry typu A spolu s bakterií *Streptococcus pneumoniae* [6]. Horní dýchací cesty jsou současně vystaveny širokému spektru potenciálních patogenních bakterií a virů. Dobře známá virově-bakteriální koinfekce v plicích je vzájemné působení chřipkových virů a bakterií *Streptococcus pneumoniae* způsobujících zápal plic.

V úvodu studie autoři vysvětlují, proč je právě toto téma světovým problémem, kterému je třeba věnovat pozornost. Uvádějí například, že celosvětově zemře více než 3,1 milionů lidí v



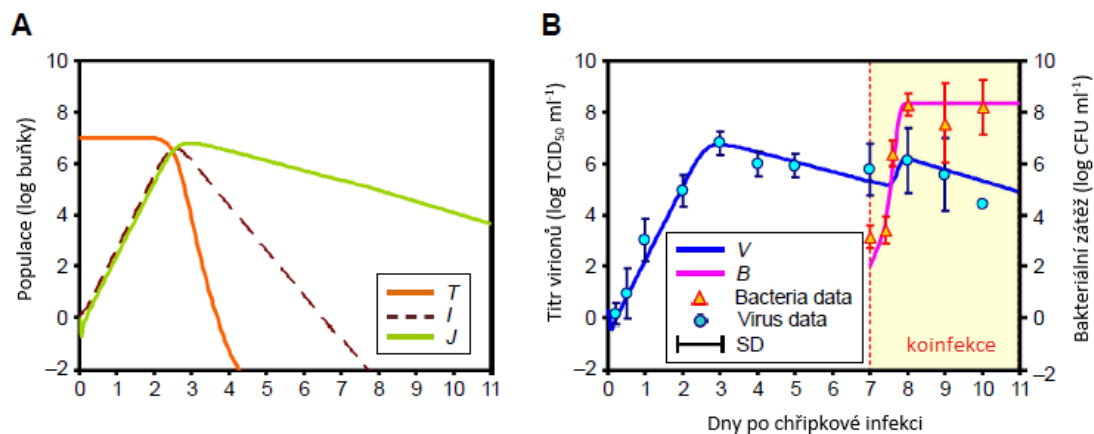
Obrázek 3.9: Schéma dynamického modelu chřipkové infekce uvnitř hostitele. Upraveno dle práce [5].

důsledku chřipky komplikované bakteriálním zápallem plic. Následně představují matematický model pro koinfekci uvnitř hostitele ke kvantifikaci virové dynamiky. Pro sestavení modelu popisujícího tuto koinfekci využili autoři nám již známý model (3.11). Postkoinfekci vyjadřují pochopitelně jak z pohledu virů chřipky, tak z hlediska bakterií *Streptococcus pneumoniae*. Poďíváme se na soustavu, kterou autoři přinášejí:

$$\begin{aligned}
\frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\
\frac{dI}{dt} &= \beta TV - kJ - \mu IB, \\
\frac{dJ}{dt} &= kI - \delta J - \mu JB, \\
\frac{dV}{dt} &= pJ(1 + aB^z) - cV, \\
\frac{dB}{dt} &= rB \left(1 - \frac{B}{K_B(1 + \psi V)}\right) - \frac{\gamma n^2 M_A^2 M_A^* B}{B^2 + n^2 M_A} \left(1 - \frac{\phi V}{K_{BV} + V}\right),
\end{aligned} \tag{3.14}$$

Soustava říká, že infikované buňky neprodukující viriony I vznikají ze zdravých buněk T po napadení virionem V , který je napadá s rychlostí β . S rychlostí k se infikované buňky stávají schopné produkovat volné viriony a parametr μ vyjadřuje jejich toxickou smrt, tedy smrt v důsledku působení bakterií B . Třetí rovnice popisuje změny v populaci buněk produkujících volné viriony J , tyto buňky umírají s rychlostí δ a smrt způsobená působením bakterií je vyjádřena parametrem μ . Produkci virionů V vyjadřuje první člen čtvrté rovnice soustavy, p je rychlost produkce virionů, a představuje uvolňování virionů v krvi a z zavádí určitou nelinearitu produkce virionů. S rychlostí c viriony umírají. Parametr r vyjadřuje rychlost růstu bakterií B , K_B je jejich nosná kapacita, ψ je zvýšení této kapacity díky přítomnosti viru. Druhá část rovnice vyjadřuje úbytek bakterií v důsledku fagocytózy, kdy γM_A je rychlost fagocytózy, M_A^* představuje ustálený stav makrofágů, F je funkce popisující fagocytózu, ϕ je pokles rychlosti fagocytózy, K_{BV} je konstanta poloviční saturace a n je maximální počet bakterií na makrofág. Vidíme, že pokud by platilo $B = 0$, tedy v organismu by se nenacházely žádné bakterie způsobující pneumonii, získali bychom model (3.11). Interakce virů chřipky a streptokoků je synergická: bakterie zvyšují rychlost produkce virionů, stejně jako viriony zvyšují nosnou kapacitu streptokoků.

Výsledky studie ukázaly, že množství infikovaných buněk neprodukujících viriony a infi-



Obrázek 3.10: Dynamika koinfekce chřipkových virionů a bakterií *Streptococcus pneumoniae*; (A) Epitelové buňky, včetně neinfikovaných T , infikované buňky neprodukující viriony I a infikované buňky produkující viriony J ; (B) patogeny sestávající z virionů chřipky V a *Streptococcus pneumoniae* B . Upraveno dle práce [6].

kovaných buněk produkujících viriony významně vzrostlo a vyvrcholilo přibližně třetí den po infekci chřipkou (obr. 3.10A). Mezitím byla špičková aktivita pozorována u viru (obr. 3.10B). Naproti tomu, když se přiblížil vrchol virového titru, neinfikované epitelální buňky dramaticky poklesly díky virionové infekci (obr. 3.10A). Po sedmém dni, zatímco došlo k výskytu bakterií, byl pozorován druhý vrchol množství viru kolem 8. dne s mírně nižší koncentrací ve srovnání s prvním vrcholem (obr. 3.10B), neboť přítomnost bakterií zvýší rychlost produkce virionů. Autoři také zjistili, že zatížení bakterií se rychle zvýšilo a dosáhlo maximální hodnoty, a to přesto, že titry viru se neustále snižovaly. Porovnání předpovědí modelu koinfekce chřipky a pneumonie s pozorovanými experimentálními daty je demonstrováno na obrázku 3.10B a ukazuje velmi dobrou shodu.

Tolik tedy k představení aktuálního výzkumu v oblasti modelování chřipkové infekce. Vidíme, že i na rozšířeních, která jsme si představili výše, se stále pracuje, stále se zdokonalují a upravují, tak, aby co nejvěrněji popisovaly skutečnost. Podobně jako v případě enzymatických reakcí i zde autoři odhadovali parametry modelu minimalizací součtu čtverců rozdílů naměřených hodnot a hodnot predikovaných modelem, s využitím různých softwarových nástrojů.

Kapitola 4

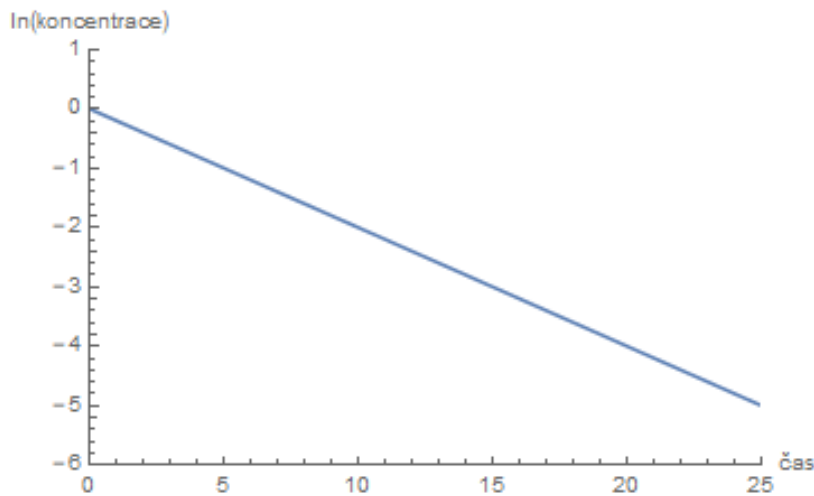
Matematické modely ve farmakologii

V této kapitole představím matematický popis toho, co se děje v organismu za přítomnosti léků. Modely, které popisují zmíněnou situaci, se zabývají vztahy mezi dávkou léku, koncentrací léku v krvi a v místě působení a jeho žádoucími a nežádoucími účinky.

Vědní obor zabývající se vývojem a aplikací matematických a statistických metod pro popis, porozumění a předpovědi kinetického a dynamického chování léků se nazývá farmakometrie. Jedná se o obor, který propojuje farmaceutické vědění, klinickou farmakologii, medicínu, výpočetní vědy, programování a statistiku.

Modely z této oblasti jsou velmi významné a užitečné ve více situacích. Popisujeme jimi získaná data, pomáhají nám pochopit komplexnost interakcí léku a biologického systému, umožňují snáze porozumět rozdílnosti mezi pacienty a experimenty a v neposlední řadě jsme díky nim schopni předpovědět výsledky netestovaných situací.

Abychom mohli porozumět těmto modelům, je třeba si nejprve popsat, z čeho vycházejí. V první části této kapitoly proto představím farmakokinetiku, následně farmakodynamiku a pak popíši základní model, který obě oblasti propojuje. Pokud by se chtěl čtenář o dané problematice dozvědět více, může ke studiu použít např. práce [9, 12], z kterých vychází i tato kapitola. V závěru kapitoly se opět podíváme na dvě aktuální studie v oblasti matematického modelování ve farmakologii. Přiblížíme si studii, která na základě matematického modelu předpovídá dávkování doxorubicinu při karcinomu prsu. Druhá studie se pak věnuje působení erenumabu na



Obrázek 4.1: Grafické řešení modelu (4.1) pro rychlostní konstantu $k_e = 0.2$.

kapsaicinem indukovaný dermální krevní tlak.

4.1 Farmakokinetika

Farmakokinetické modely nám umožňují pochopit cestu léku v těle, změny v jeho koncentraci. Můžeme díky nim kvantifikovat absorpci, distribuci, metabolismus a vyloučení léku z těla. Modely mohou být jednosložkové nebo vícesložkové.

V případě jednosložkového modelu modelujeme změnu množství léku v těle rovnicí

$$\frac{d[C_p]}{dt} = -k_e[C_p], \quad (4.1)$$

kde $[C_p]$ je koncentrace léku v krevní plazmě a k_e je konstanta škálující rychlost vylučování léku. Pokles koncentrace léku v organismu, který popisuje rovnice (4.1), vidíme také na obrázku 4.1. Rychlostní konstanta k_e se stanovuje jako poměr rychlosti odbourávání léku CL (clearance rate) a distribučního objemu V_d (volume of distribution). Pro rychlostní konstantu tedy platí

$$k_e = \frac{CL}{V_d}. \quad (4.2)$$

Distribuční objem V_d je definován jako celkový objem plazmy, ve kterém by bylo potřeba rozpustit celkové množství léku v těle tak, aby odrazil koncentraci léku v plazmě. Je důležité si

uvědomit, že koncentrace léku $[C_p]$ v plazmě není nutně stejná v játrech, ledvinách nebo jiných tkáních. Pokud známe distribuční objem a množství léku X v nějaké tkáni, můžeme vypočítat koncentraci léku v plazmě jako:

$$[C_p] = \frac{X}{V_d}. \quad (4.3)$$

Znalost rychlostní konstanty je nezbytná pro stanovení tzv. poločasu reakce. To je doba, za kterou klesne koncentrace léku v plazmě na poloviční množství. Odvoďme si nyní tento čas jednosložkový model. Vydeme z diferenciální rovnice (4.1), kterou budeme řešit pomocí metody separace proměnných. Postup je následující:

$$\begin{aligned} -\frac{1}{[C_p]} \frac{d[C_p]}{dt} &= k_e, \\ -\ln[C_p](t) + \ln[C_p](0) &= k_e t, \\ \ln \frac{[C_p](t)}{[C_p](0)} &= -k_e t, \\ \frac{[C_p](t)}{[C_p](0)} &= e^{-k_e t}, \\ [C_p](t) &= [C_p](0)e^{-k_e t}, \\ \frac{[C_p](0)}{2} &= [C_p](0)e^{-k_e t_{1/2}}. \end{aligned}$$

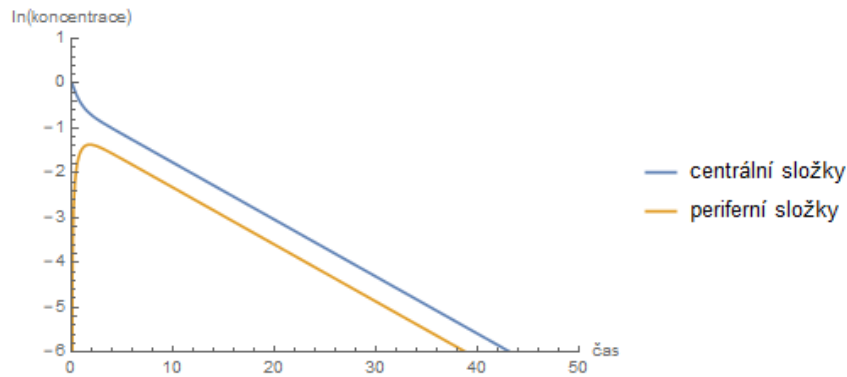
Pro poločas reakce nakonec máme

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}. \quad (4.4)$$

Častěji se k popisu kinetiky léků používají dvousložkové modely, protože k jeho distribuci po těle nedochází okamžitě. Soustava diferenciálních rovnic popisující dvousložkový model vypadá následovně [12]:

$$\begin{aligned} \frac{d[C_p]}{dt} &= -\frac{CL}{V_p}[C_p] - \frac{Q}{V_p}[C_p] + \frac{Q}{V_o}[C_o], \\ \frac{d[C_o]}{dt} &= -\frac{Q}{V_o}[C_o] + \frac{Q}{V_p}[C_p], \end{aligned} \quad (4.5)$$

kde $[C_p]$, $[C_o]$ představují koncentraci léku v plazmě a orgánech a V_p , V_o jsou odpovídající distribuční objemy těchto složek, Q je mezisložkové odbourávání léku. Grafické řešení této soustavy ukazuje obrázek 4.2.



Obrázek 4.2: Grafické řešení modelu (4.5) pro rychlostní konstanty $\frac{CL}{V_p} = 0.2$, $\frac{Q}{V_p} = 0.5$ a $\frac{Q}{V_o} = 1$ a pro počáteční podmínky $C_p(0) = 1$, $C_o(0) = 0$. Modrá křivka představuje řešení první rovnice popisující změny v koncentraci léku v plazmě a žlutá křivka je řešení druhé rovnice, tedy koncentrace léku v orgánech.

Ukažme si řešení této soustavy. Nejprve spočítáme determinant matice soustavy (4.5), abychom zjistili jestli budou všechna vlastní čísla nenulová či nikoli:

$$\begin{vmatrix} -\frac{CL+Q}{V_p} & \frac{Q}{V_o} \\ \frac{Q}{V_p} & -\frac{Q}{V_o} \end{vmatrix} = \frac{(CL+Q) \cdot Q}{V_p V_o} - \frac{Q^2}{V_p V_o} = \frac{CL \cdot Q}{V_p V_o}.$$

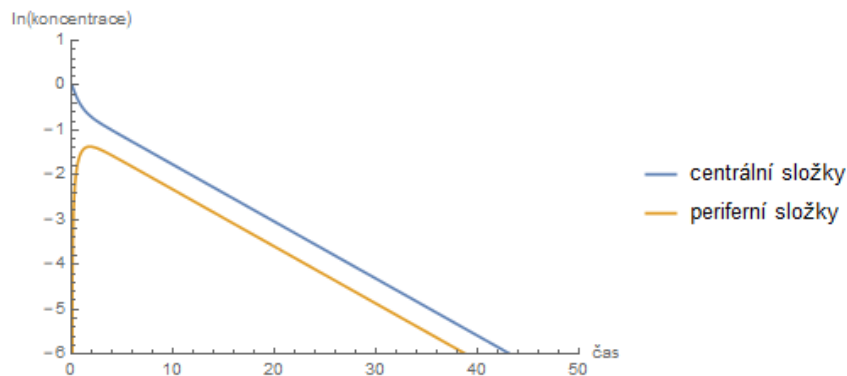
Determinant je nenulový (parametry nejsou nulové), získáváme tedy dvě nenulová vlastní čísla, která spočítáme jako kořeny polynomu

$$\begin{vmatrix} -\frac{CL+Q}{V_p} - \lambda & \frac{Q}{V_o} \\ \frac{Q}{V_p} & -\frac{Q}{V_o} - \lambda \end{vmatrix} = \lambda^2 + \left(\frac{V_o(CL+Q) + V_p Q}{V_p V_o} \right) \lambda + \frac{CL}{V_p V_o}.$$

Nechť má získaná rovnice dva různé kořeny λ_1, λ_2 a necht' v, u jsou vlastní vektory příslušné k vlastním číslům λ_1, λ_2 . Pak obecné řešení systému (4.5) má tvar

$$\begin{pmatrix} C_p \\ C_o \end{pmatrix} = e^{\lambda_1 t} \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \end{pmatrix} c_1 + e^{\lambda_2 t} \begin{pmatrix} u_1 \\ u_2 \end{pmatrix} c_2.$$

Pokud dosadíme parametry, pro něž je řešení vykresleno na obrázku 4.2, tedy hodnoty $\frac{CL}{V_p} = 0.2$,



Obrázek 4.3: Graf funkcí daných předpisem (4.6).

$\frac{Q}{V_p} = 0.5$ a $\frac{Q}{V_o} = 1$, získáme konkrétní řešení tvaru

$$\begin{pmatrix} C_p \\ C_o \end{pmatrix} = \exp\left(\frac{-1.7 + \sqrt{2.19}}{2}t\right) \begin{pmatrix} 1 \\ 0.573 \end{pmatrix} 0.604 + \exp\left(\frac{-1.7 - \sqrt{2.19}}{2}t\right) \begin{pmatrix} 1 \\ -0.873 \end{pmatrix} 0.396. \quad (4.6)$$

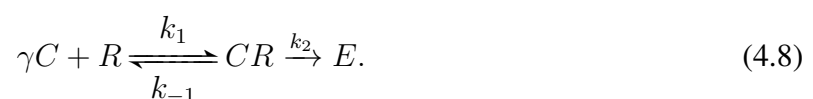
Vykreslení spočítaného řešení vidíme na obrázku 4.3. Pokud porovnáme oba obrázky, vidíme, že si odpovídají.

Celkové působení léku se často popisuje jako plocha pod křivkou závislosti koncentrace léku na čase:

$$P = \int_0^{\infty} [C_p](t)dt. \quad (4.7)$$

4.2 Farmakodynamika

Pokud posuzujeme účinnost léku, sledujeme dva procesy. Prvním procesem je navázání léku na receptor a následná aktivace tohoto receptoru lékem. Druhým procesem je pak šíření této počáteční aktivace receptoru a následný vznik farmakologických účinků léku, které pozorujeme. Platí, že intenzita farmakologického účinku je úměrná počtu receptorů aktivovaných lékem. Tyto poznatky můžeme shrnout následovně:



Tato rovnice předpokládá, že γ molekul účinné látky léku C aktivuje receptor R za vzniku komplexu lék-receptor CR , který vyvolá účinek E . Rychlostní konstantu k_2 můžeme dát do vztahu s koncentrací komplexu lék-receptor $[CR](t)$ a farmakologickým účinkem $E(t)$, zmíněný vztah je následující:

$$E(t) = k_2[CR](t). \quad (4.9)$$

Po obsazení celkového počtu receptorů R_0 nastává maximální farmakologický účinek a platí:

$$E_{max} = k_2R_0. \quad (4.10)$$

Při koncentraci léku $[C](t)$ a celkovém počtu receptorů R_0 pak můžeme sestavit rovnici

$$\frac{d[CR]}{dt} = k_1[C]^\gamma(t)[R_0 - [CR](t)] - k_{-1}[CR](t) \quad (4.11)$$

s počáteční podmínkou

$$[CR](0) = 0. \quad (4.12)$$

V ekvilibriu pak platí:

$$[CR]^* = \frac{R_0[C]^{\gamma*}}{k_D + [C]^{\gamma*}}, \quad (4.13)$$

kde K_D je disociační konstanta komplexu lék-receptor a je dána poměrem rychlostních konstant k_{-1}, k_1 , $[CR]^*$ a $[C]^*$ jsou koncentrace komplexu lék-receptor a léku, kterých dosahují v ekvilibriu. Kombinací této rovnice spolu s rovnicemi (4.9) a (4.10) získáme rovnici pro tzv. sigmoidální E_{max} model:

$$E^* = \frac{E_{max}[C]^{\gamma*}}{k_D + [C]^{\gamma*}}. \quad (4.14)$$

V případě, že je γ rovno jedné, se model (4.14) nazývá základní E_{max} model. Sigmoidální model však umožňuje v porovnání se základním E_{max} modelem více flexibility.

Za předpokladu rychlého ustavení rovnováhy lék-receptor, tedy $[C]^* \approx [C](t)$, můžeme rovnici (4.14) přepsat do tvaru

$$E^*(t) = \frac{E_{max}[C]^\gamma(t)}{k_D + [C]^\gamma(t)}, \quad (4.15)$$

z kterého vidíme, že farmakologický účinek je závislý na čase prostřednictvím aktuální koncentrace léku C .

Nejčastěji se k vyjádření vztahu mezi koncentrací léku $[C]$ a jeho účinkem používá právě E_{max} model

$$E = \frac{E_{max}[C]^\gamma}{EC_{50}^\gamma + [C]^\gamma}, \quad (4.16)$$

kde E_{max} je maximální účinek léku a EC_{50}^γ je koncentrace léku potřebná k vyvolání polovičního účinku, kterého lze dosáhnout. Měření účinku v jakémkoli daném čase je pak určeno funkcí jeho hodnoty bez léku E_0 a koncentrací léku $[C]$:

$$E = E_0 \pm \frac{E_{max}[C]^\gamma}{EC_{50}^\gamma + [C]^\gamma}. \quad (4.17)$$

Získaný E_{max} model popisuje buď posílení nebo potlačení účinku užitím léku.

Protože model (4.8) a následné odvození sigmoidálního modelu (4.17) je pouze aproximací reality, upouští se ve výsledném modelu (4.17) od mechanické interpretace parametru γ jako počtu molekul účinné látky léku. Místo toho se parametr γ chápe jako volný parametr, jehož hodnota je určena tak, aby model (4.17) co nejlépe popisoval naměřená data, a může tedy nabývat i neceločíselných hodnot.

4.3 Farmakokineticko-dynamické modely

Propojením farmakokinetických a farmakodynamických studií můžeme charakterizovat časový průběh účinků léku. Farmakokineticko-dynamický model, který si popíšeme, má několik částí. Obsahuje model popisující růst populace bakterií, dále model charakterizující změny koncentrace léku v čase a poslední částí jsou interakce mezi oběma modely. Popíšeme si nyní jednotlivé části.

Model popisující změny v populaci bakterií

V tomto modelu, jak je již zmíněno výše, budeme uvažovat rozmnožování bakterií B s rychlostní konstantou k_g a jejich smrt s rychlostní konstantou k_d . Za předpokladu exponenciálního růstu má rovnice tvar:

$$\frac{dB}{dt} = k_g B - k_d B \quad (4.18)$$

Pokud v organismu nejsou přítomné léky a $k_g > k_d$, roste tedy populace bakterií exponenciálně.

Model popisující změny v koncentraci léku

Budeme uvažovat jednosložkový farmakokinetický model, který je popsán rovnicí

$$\frac{d[C_p]}{dt} = -k_e[C_p],$$

kde $[C_p]$ je koncentrace léku v krevní plazmě a k_e je rychlostní konstanta udávající, že rychlost vylučování léku v daném čase je úměrná množství léku zbývajícimu v systému.

Pro jednoduché systémy se předpokládá, že koncentrace léku je konstantní, i když některé druhy léků vykazují během experimentů poklesy v koncentraci. Proto je měření koncentrace v průběhu experimentů nezbytné.

Farmakologický model

Posledním krokem, který nám zbývá, je oba předchozí modely propojit. Vznikají tak rovnice, které například popisují působení antibakteriálních léčiv na bakterie. Obecně se předpokládá, že antimikrobiální účinek je nelineárně závislý na koncentraci léku a modeluje se pomocí sigmoidálního E_{max} modelu. Lék může buď inhibovat růst bakterií jako v rovnici (4.19) nebo zkracovat délku jejich života, což popisují rovnice (4.20) a (4.21):

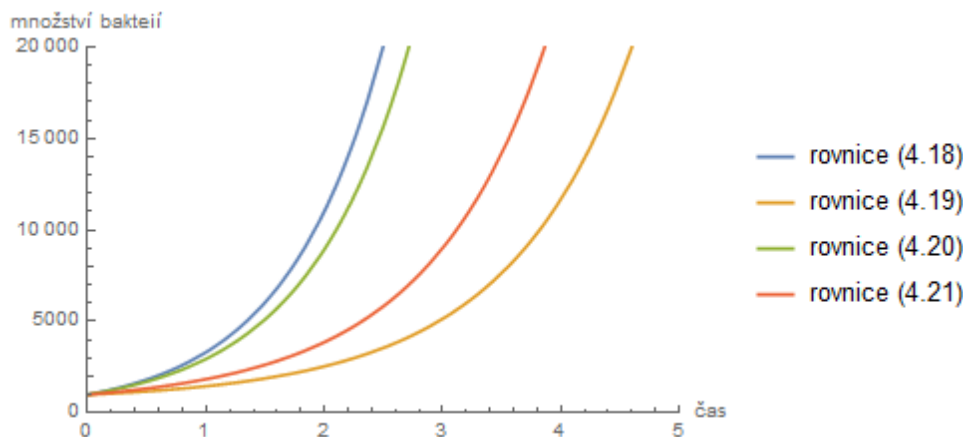
$$\frac{dB}{dt} = k_g \left(1 - \frac{E_{max}[C_p]^\gamma}{Ec_{50}^\gamma + [C_p]^\gamma} \right) B - k_d B \quad (4.19)$$

$$\frac{dB}{dt} = k_g B - k_d \left(1 + \frac{E_{max}[C_p]^\gamma}{Ec_{50}^\gamma + [C_p]^\gamma} \right) B \quad (4.20)$$

$$\frac{dB}{dt} = k_g B - k_d B - \left(\frac{E_{max}[C_p]^\gamma}{Ec_{50}^\gamma + [C_p]^\gamma} \right) B \quad (4.21)$$

V rovnici (4.20) je účinnost popisována jako proporcionalní nárůst mortality bakterií. Naopak v rovnici (4.21) je účinek léku popsán jako aditivní navýšení rychlosti umírání bakterií díky působení léku. To jsou však jen základní varianty nejjednoduššího modelu, v komplikovanějších modelech bakteriálního růstu může být účinek a tudíž také model komplikovanější.

Na obrázku 4.3 vidíme grafické řešení těchto tří rovnic a rovnice (4.18), která popisuje situaci bez léku. Všimněme si, že nejpomaleji roste žlutá křivka znázorňující řešení rovnice, kdy lék úměrně zpomaluje růst populace bakterií. Naopak nejrychleji roste křivka představující řešení rovnice bez léku (modrá křivka).



Obrázek 4.4: Grafické řešení rovnic (4.18), (4.19), (4.20) a (4.21) pro parametry $C_p(0) = 2, B(0) = 10^3, \gamma = 1.5, E_{c_{50}} = 10, k_g = 1.4, k_d = 0.2, E_{max} = 3, k_e = 0.2$. Parametry převzaty z práce [12].

4.3.1 Rozšíření základního modelu

Stejně jako jsme si v kapitole o modelování interakcí virionů s organismem vždy představili základní model a některá jeho rozšíření, i zde se na některá taková rozšíření podíváme. Budeme předpokládat, že organismus má určitou odolnost vůči antibiotikům. Odolnost může vznikat na základě různých podnětů [12].

Rezistentní subpopulace bakterií

Jedním z nejpoužívanějších způsobů, jak odolnost organismu vysvětlit, je uvažování určitých subpopulací bakterií. V takovém případě předpokládáme, že populace bakterií se skládá z několika subpopulací, které mají rozdílnou citlivost na léky. Zpravidla se uvažuje jedna, dvě nebo tři takové subpopulace. Rozdílnost těchto subpopulací se uvažuje jako rozdílnost hodnoty E_{max} nebo $E_{c_{50}}$ nebo obou hodnot. Podívejme se, jakým způsobem se model změní, pokud budeme uvažovat dvě subpopulace, kdy účinek léku modelujeme jako aditivní navýšení rychlosti umírání bakterií

$$\begin{aligned} \frac{dB_1}{dt} &= k_g B_1 - k_d B_1 - \frac{E_{max-B_1} [C_p]^\gamma}{c^\gamma + E_{c_{50-B_1}}^\gamma} B_1, \\ \frac{dB_2}{dt} &= k_g B_2 - k_d B_2 - \frac{E_{max-B_2} [C_p]^\gamma}{c^\gamma + E_{c_{50-B_2}}^\gamma} B_2. \end{aligned} \quad (4.22)$$

Adaptivní rezistence

Jiným možným vysvětlením odolnosti organismu je předpoklad vzniku rezistence, která vzniká v průběhu času. Do rovnice popisující účinek léku jako aditivní navýšení rychlosti umírání bakterií zahrnujeme časově závislý adaptační faktor $\alpha > 1$, který zvyšuje hodnotu parametru E_{c50} na hodnotu αE_{c50} a pro který platí:

$$\alpha = 1 + \beta (1 - \exp([C_p]t\tau)), \quad (4.23)$$

kde β je parametr popisující maximální adaptační rezistenci a τ popisuje rychlost adaptace. Celkový model uvažující adaptivní rezistenci bakterií má pak následující tvar:

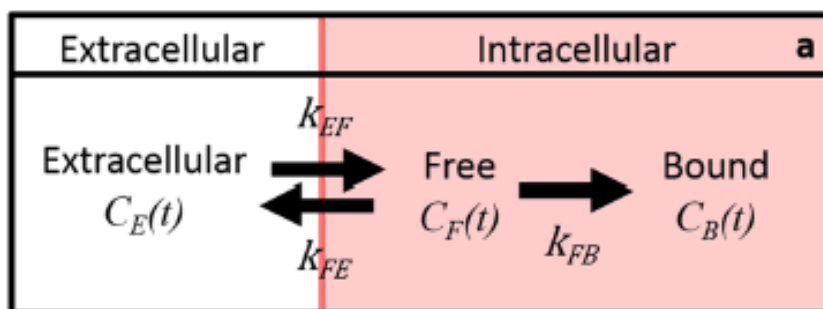
$$\frac{dB}{dt} = k_g B - k_d B - \frac{E_{max} [C_p]^\gamma}{[C_p]^\gamma + \{[1 + \beta (1 - \exp([C_p]t\tau))]\} E_{c50}^\gamma} B. \quad (4.24)$$

4.4 Aktuální výzkum v oblasti modelování ve farmakologii

Stejně jako u předchozích kapitol i zde si představíme dvě studie z posledních let. Nejprve se podíváme na studii, kde autoři na základě matematického modelu předpovídají dávku doxorubicinu u karcinomu prsu [10]. Doxorubicin slouží jako základ pro několik chemoterapeutických režimů, které se používají při léčbě maligních nádorů včetně určitého karcinomu prsu. Jeho hlavním úkolem je poškodit DNA nádorových buněk, aby se již nemohly dále dělit.

Pro popis absorpce a vazby doxorubicinu v rakovinných buňkách použili autoři tříložkový farmakokinetický model. Předpokládali, že doxorubicin vstupuje do buněk prostřednictvím difúze. V buňce je pak doxorubicin přemístěn do jádra, kde se vsouvá do DNA a stabilizuje komplex topoizomerázy II. Doxorubicin může být také z buněk aktivně vytlačován pomocí p-glykoproteinu. Tyto procesy popisuje následující model:

$$\begin{aligned} \frac{dC_E(t)}{dt} &= k_{FE} \frac{v_I}{v_E} C_F(t) - k_{EF} C_E(t), \\ \frac{dC_F(t)}{dt} &= k_{EF} \frac{v_E}{v_I} C_E(t) - k_{FE} C_F(t) - k_{FB} C_F(t), \\ \frac{dC_B(t)}{dt} &= k_{FB} C_F(t), \end{aligned} \quad (4.25)$$



Obrázek 4.5: Schéma třísložkové kinetiky doxorubicinu. Převzato ze studie [10].

kde C_E, C_F, C_B jsou koncentrace doxorubicinu v extracelulárním, volném a vázaném intracelulárním stavu v čase t . Volná část představuje lék, který difundoval do buňky, zatímco vázaná komponenta představuje lék, který se navázal na DNA. Parametry k_{ij} jsou rychlostní konstanty, které popisují pohyb doxorubicinu mezi jednotlivými složkami modelu, například k_{FE} popisuje rychlost přenosu volného léčiva z buňky ven. Objemy intracelulárních a extracelulárních oddílů jsou označeny v_I, v_E . Popsané schéma vidíme na obrázku 4.4.

Doxorubicin indukuje poškození DNA vsouváním se do DNA, čímž stabilizuje komplex topoisomerasy II a indukuje poškození DNA tvorbou volných radikálů. Při vysokých dávkách dochází k rozsáhlému poškození DNA, které často vede k smrti buněk prostřednictvím apoptózy. Nízké až střední dávky doxorubicinu indukují stárnutí buněk a buněčná smrt nastává primárně mitotickou katastrofou. Zatímco apoptóza je okamžitá (v řádu hodin až dnů), mitotická katastrofa je poměrně dlouhý proces (v řádu několika dnů). Tyto procesy autoři modelovali logistickým růstovým modelem, který modifikovali dvěma funkcemi odrážejícími odlišné formy buněčné

smrti, a to následujícím způsobem:

$$\frac{dN_{TC}(t)}{dt} = (k_p - k_d(t, D))N_{TC}(t) \left(1 - \frac{N_{TC}(t)}{\theta(t)}\right),$$

$$k_d(t, D) = \begin{cases} 0 & \text{pro } t < 0 \\ k_{d,A}(D) & \text{pro } t \geq 0 \end{cases} \quad (4.26)$$

$$k_d(t, D) = \begin{cases} 0 & \text{pro } t < 0 \\ k_{d,B}(D)r(D)t \exp(1 - r(D)t) & \text{pro } t \geq 0, \end{cases}$$

kde k_p a k_d jsou rychlosti proliferace a úmrtnosti buněk, parametr r popisuje rychlost, při které léčba indukuje účinek, θ představuje nosnou kapacitu popisující maximální počet buněk, které mohou být podporované experimentálním systémem a $N_{TC}(t)$ je počet nádorových buněk v čase t . Dávka léku D odráží koncentraci a dobu působení léku a je definována jako maximální možná koncentrace vázaného doxorubicinu $C_{B,max}$, které je dosaženo během studované časové periody ve farmakokinetickém modelu (4.25).

Autoři zjistili, že pro popis absorpce doxorubicinu v různých typech buněk postačí tříložkový model. Dále autoři porovnávají rychlost růstu buněk. Před léčbou doxorubicinem v čase $t = 0$ každý typ buněk vykazoval exponenciální růst. V neošetřených kontrolách vykazovaly tyto buňky logistický růst. Po léčbě se reakce lišily od pokračujícího pozitivního růstu až po okamžitou regresi populace. Studie dále ukazuje, že při nízkých dávkách má doxorubicin malý účinek a buněčné populace rostou exponenciálně. Vzhledem k nárůstu koncentrace a času expozice se zdá, že tempo růstu populace se zpomaluje. Při vysokých dávkách se buněčná populace rychle snižuje.

V rámci druhé studie se podíváme na farmakokineticko-dynamický vztah erenumabu a kapsaicinu, podporujícího dermální průtok krve, u zdravých jedinců a jedinců trpících na migrény [21]. Kapsaicinem indukovaný dermální průtok krve je validovaný biomarker používaný k vyhodnocení účinnosti látek pro léčbu migrény. K charakterizaci farmakokinetiky a kvantifikaci inhibičních účinků erenumabu na indukovaný dermální průtok krve autoři shromáždili data ze studie s jednou a více dávkami u zdravých a migrénních jedinců. Hodnotili vliv věku, tělesné hmotnosti i pohlaví.

Pro modelování kinetiky absorpce erenumabu použili autoři jednosložkový model (4.1):

$$\frac{d[A_{SC}]}{dt} = -k_a[A_{SC}], \quad (4.27)$$

s počáteční podmínkou

$$[A_{SC}](0) = \frac{1}{1 + \exp(F)} D_{SC}, \quad (4.28)$$

kde $[A_{SC}]$ je koncentrace erenumabu podaná podkožně, k_a je konstanta absorpce této látky, zlomek $\frac{1}{1 + \exp(F)}$ vyjadřuje biologickou dostupnost a D_{SC} je dávka léku aplikovaná podkožně. Autoři dále představují rovnici popisující koncentraci nevázaného erenumabu v periferních složkách (orgánech) $[A_o]$ a diferenciální rovnici popisující změny v celkovém množství této látky v centrálních složkách (plazmě) $[A_p]$:

$$\begin{aligned} \frac{d[A_p]}{dt} &= k_a[A_{SC}] + k_{op}[A_o] - k_{int}[A_p] - (k_{po} + k_{pe} - k_{int})[AMG334]_{unbound}V_p, \\ \frac{d[A_o]}{dt} &= k_{po}[AMG334]_{unbound}V_p - k_{pe}[A_o], \end{aligned} \quad (4.29)$$

kde V_p je distribuční objem v plazmě, k_{int} je konstanta rychlosti internalizace pro vázaný erenumab, k_{op} , k_{po} jsou rychlostní konstanty procesů, kdy lék přechází z periferních složek do složek centrálních a naopak, k_{pe} je rychlostní konstanta eliminace erenumabu z centrálních složek a $[AMG334]_{unbound}$ je koncentrace nevázaného erenumabu.

V rámci farmakodynamického modelu stanovují autoři hodnotu dermálního průtoku krve jako rozdíl jeho hodnoty před podáním erenumabu (ΔDBF_0) a po jeho aplikaci (ΔDBF_t):

$$\Delta DBF_t = \Delta DBF_0 \left(1 - \frac{I_{max}[AMG334]^h}{IC_{50} + [AMG334]^h} \right), \quad (4.30)$$

kde I_{max} je maximální inhibice dermálního průtoku krve díky léčbě erenumabem, IC_{50} je koncentrace erenumabu při poloviční maximální inhibici dermálního průtoku krve a h je Hillův koeficient (parametr γ v našem sigmoidálním modelu (4.14)). Představme si alespoň některé výsledky této studie.

Autoři zjistili, že dvousložkový model, který předpokládá vazbu erenumabu do centrálních složek (plazmy), nejlépe popsal nelineární farmakokinetiku erenumabu. Poločas podkožní absorpce stanovili na 1,6 dne. Maximální inhibice I_{max} dermálního průtoku krve indukovaného

kapsaicinem, jakou může erenumab vyvolat, je dle autorů 89%. Autoři také stanovili množství erenumabu nutné pro dosažení 50% a 99% inhibice z maximální možné na 255 ng/ml a 1134 ng/ml.

Kapitola 5

Komplexní model léčby virové infekce

5.1 Abstrakt

Vytvořila jsem několik komplexních modelů léčby virové infekce, které jsem zkoumala a analyzovala. Porovnávala jsem léčbu lékem snižujícím produkci virionů a lékem, který zvyšuje jejich mortalitu. U obou modelů jsem pozorovala, že s vyšší rychlostí dodávání léku klesá maximální množství virionů, ale zpočátku se prodlužuje délka nemoci, kterou definuji jako dobu, za kterou klesne množství virionů pod jejich počáteční úroveň. Výrazněji jsou tyto trendy vidět u modelu, kde lék zvyšuje mortalitu virionů. Také jsem srovnávala situaci, kdy do organismu dodáváme lék nebo prekurzor léku. Zjistila jsem, že rozdíl mezi podáním léku a prekurzoru léku je pro použité parametry minimální. Nelze jednoznačně říci, který typ léku je vhodnější, záleží vždy na druhu nemoci. Pokud je prioritou zkrátit dobu trvání infekce, je vhodnější podat lék, který snižuje produkci virionů. Pokud je důležitější snížit maximální množství virionů v těle i za cenu delšího trvání infekce, je lepší podávat lék, který zvyšuje jejich mortalitu.

5.2 Úvod

V rámci své diplomové práce jsem se rozhodla zkoumat model, který bude určitým způsobem popisovat individuální léčbu infekce. Obdobný model jsem v literatuře nenašla, tak jsem ho vy-

tvořila. V kapitole 2 této práce jsme se seznámili s kinetikou enzymatických reakcí. Kapitola 3 pojednává o dynamice virových infekcích. Na modelu popisujícím infekci chřipky je postaven i model, který je představen v této kapitole. A v kapitole 4 jsme si ukázali modelování situace, kdy je v organismu přítomný lék. Můžeme říci, že každá kapitola pojednává o jedné části celku, totiž o situaci, kdy virovou infekci léčíme lékem, jenž v těle vzniká enzymatickou reakcí s jistým prekurzorem tohoto léku. V této kapitole si několik modelů takové situace odvodíme, budeme je studovat a srovnáme a posoudíme tak vliv několika druhů léčby na průběh infekce. Budeme studovat varianty s dodáváním léku či s dodáváním pouze prekurzoru tohoto léku, a varianty s lékem snižujícím produkci virionů či zvyšujícím jejich mortalitu.

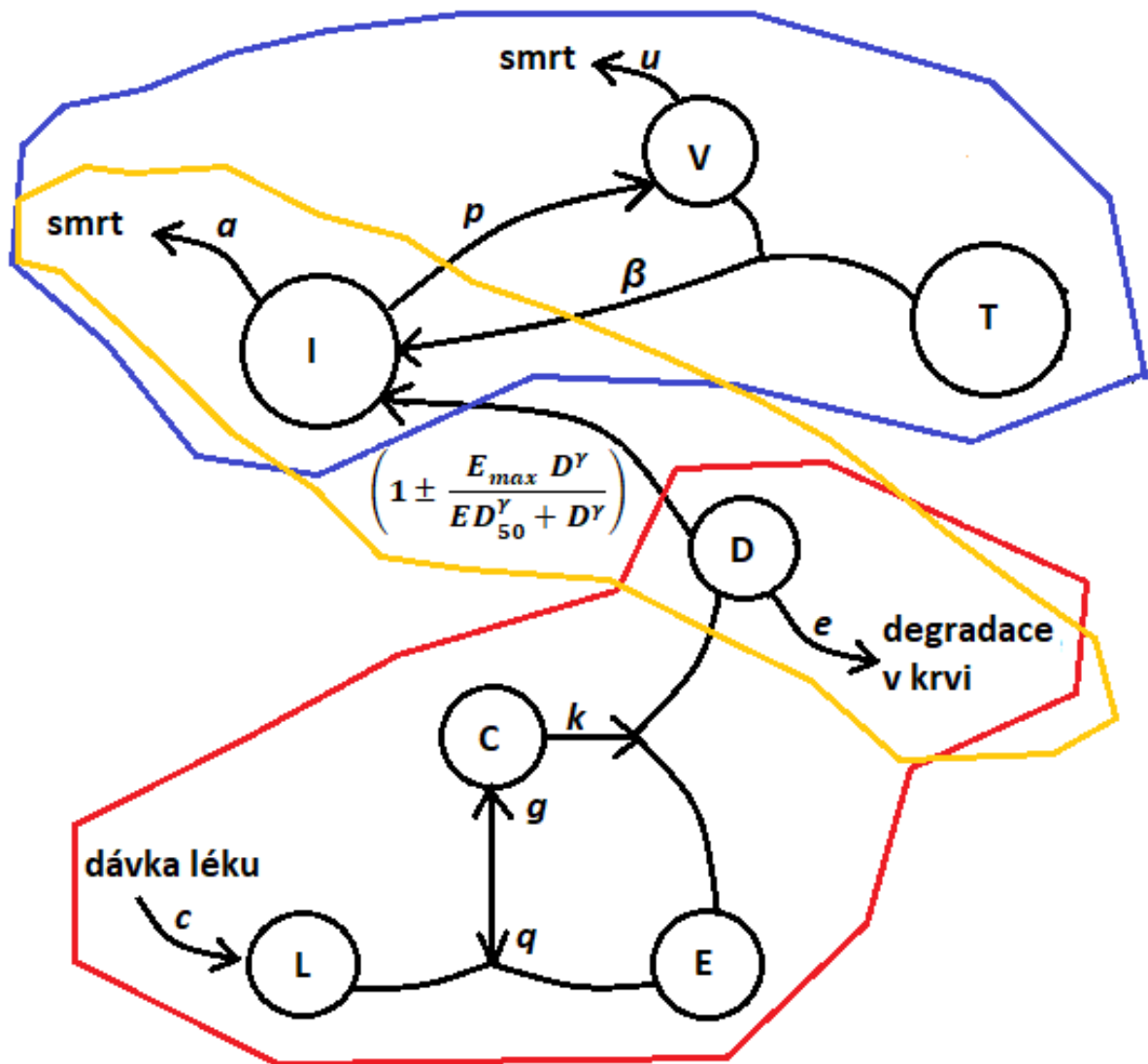
Celá tato kapitola obsahuje originální výsledky, a to včetně formulace jednotlivých variant studovaných modelů. Kapitola 5 je strukturována následovně. V části 5.3 jednotlivé modely odvodíme a v části 5.4 je budeme studovat. Část 5.5 je pak věnována srovnání jednotlivých navržených modelů a diskuzi výsledků dosažených v této kapitole.

5.3 Metodika

Základem všech modelů, které v této kapitole odvodím, je model kinetiky virové infekce. Budu vycházet ze základního modelu popisujícího průběh chřipkové infekce, a sice z modelu (3.9) z kapitoly 3:

$$\begin{aligned}\frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\ \frac{dI}{dt} &= \beta TV - aI, \\ \frac{dV}{dt} &= pI - uV.\end{aligned}\tag{5.1}$$

Tento model předpokládá, že se v těle kromě zdravých buněk T nacházejí také infikované buňky I , které s rychlostí p produkují volné viriony V . S rychlostí β pak tyto viriony interagují se zdravými buňkami, které se tímto stávají buňkami infikovanými. Parametry a a u představují rychlosti umírání infikovaných buněk a volných virionů. Na obrázku 5.1 je schéma interakcí popsaných modelem (5.1) ohraničeno modrou barvou.



Obrázek 5.1: Schéma modelů (5.1) - (5.8) vyvinutých a studovaných v této kapitole a skládajících se ze základního modelu chřipkové infekce (modrá oblast), z farmakologického modelu (žlutá oblast) a z modelu popisujícího enzymatickou kinetiku (červená oblast).

5.3.1 Vliv léku na růst populace virionů

Protože je cílem mého snažení modelovat léčbu infekce, rozšířím model (5.1) o tento prvek. Předpokládám, že do těla je kontinuálně (například prostřednictvím kapačky) dodáván lék D konstantní rychlostí c . Pro tento lék uvažuji jednosložkovou kinetiku popsanou rovnicí (4.1) v kapitole 4. Zároveň pro popis účinku léku uvažuji sigmoidální E_{max} model (4.14), který už také známe z předchozí kapitoly.

Budu-li nejprve uvažovat, že účinkem léku dojde k poklesu produkce virionů infikovanými buňkami, změní se model (5.1) na model:

$$\begin{aligned}\frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\ \frac{dI}{dt} &= \beta TV - aI, \\ \frac{dV}{dt} &= pI \left(1 - \frac{E_{max}D^\gamma}{ED_{50}^\gamma + D^\gamma}\right) - uV, \\ \frac{dD}{dt} &= c - eD.\end{aligned}\tag{5.2}$$

Nově přidaná rovnice pro proměnnou D popisuje dynamiku léku v krvi, přičemž e je rychlost degradace léku v krvi. Maximální účinek léku je popsán bezrozměrným parametrem E_{max} , parametr ED_{50} udává koncentraci léku, při níž je dosaženo poloviny maximálního účinku a bezrozměrný parametr γ reprezentuje Hillův koeficient. V obrázku 5.1 je tato část modelu zvýrazněna žlutou barvou.

Tímto jsem propojila dvě oblasti modelování, kterým jsem se v práci věnovala. Přinejmenším z výukových důvodů bych však ráda uvažovala i oblast modelování kinetiky enzymatických reakcí. Spekulovala jsem proto, že podaná látka L musí nejprve reagovat s enzymem E za vzniku vlastní léčivé látky D . Podaná látka L je tedy jakýsi prekurzor léku D . Necht' rychlostní konstanta reakce prekurzoru s enzymem za vzniku komplexu prekurzor-enzym C je g a rychlostní konstanta zpětné reakce je q . Necht' se komplex rozpadá na lék D a enzym E s rychlostí k . K modelu (5.2) tak musím přidat tři rovnice popisující změny v množství prekurzoru L , enzymu E a komplexu prekurzor-enzym C , které vycházejí z modelu (2.4) v kapitole 2. Podívejme se na

úplnou soustavu diferenciálních rovnic:

$$\begin{aligned}
 \frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\
 \frac{dI}{dt} &= \beta TV - aI, \\
 \frac{dV}{dt} &= pI \left(1 - \frac{E_{max} D^\gamma}{ED_{50}^\gamma + D^\gamma} \right) - uV, \\
 \frac{dD}{dt} &= kC - eD, \\
 \frac{dE}{dt} &= kC + qC - gLE, \\
 \frac{dC}{dt} &= gLE - qC - kC, \\
 \frac{dL}{dt} &= c + qC - gLE.
 \end{aligned} \tag{5.3}$$

Na obrázku 5.1 vidíme tyto enzymatické děje vyznačeny červenou barvou. Podařilo se mi tedy propojit všechny tři vybrané oblasti matematického modelování. Model (5.3) můžeme zjednodušit uvažováním kinetiky Michaelise-Mentenové. Enzym je katalyzátor, není spotřebováván a součet koncentrace volného a vázaného enzymu je tedy v čase konstantní (e_0). Platí tedy:

$$\frac{dE}{dt} + \frac{dC}{dt} = 0 \Rightarrow E(t) + C(t) = e_0 \Rightarrow E(t) = e_0 - C(t).$$

System (5.3) se nám tedy zjednoduší na systém:

$$\begin{aligned}
 \frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\
 \frac{dI}{dt} &= \beta TV - aI, \\
 \frac{dV}{dt} &= p \left(1 - \frac{E_{max} D^\gamma}{ED_{50}^\gamma + D^\gamma} \right) I - uV, \\
 \frac{dD}{dt} &= kC - eD, \\
 \frac{dC}{dt} &= gL(e_0 - C) - qC - kC, \\
 \frac{dL}{dt} &= c + qC - gL(e_0 - C).
 \end{aligned} \tag{5.4}$$

Stejně jako u systému (2.8) můžeme i zde předpokládat rychlou dynamiku komplexu C vzhledem k ostatním stanovovaným proměným, $\frac{dC}{dt} \approx 0$, a tedy vyjádřit koncentraci komplexu C v závislosti na koncentraci léku L jako

$$C = \frac{ge_0L}{gL + q + k}. \quad (5.5)$$

Po dosazení do modelu (5.4) konečně dostaneme model

$$\begin{aligned} \frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\ \frac{dI}{dt} &= \beta TV - aI, \\ \frac{dV}{dt} &= p \left(1 - \frac{E_{max}D^\gamma}{ED_{50}^\gamma + D^\gamma} \right) I - uV, \\ \frac{dD}{dt} &= \frac{ge_0Lk}{gL + q + k} - eD, \\ \frac{dL}{dt} &= c - \frac{ge_0Lk}{gL + q + k}. \end{aligned} \quad (5.6)$$

5.3.2 Vliv léku na mortalitu populace virionů

Alternativně budu předpokládat, že lék bude způsobovat smrt virionů. Účinnost léku tedy popíši za pomoci rovnice (4.20). Model při přímém působení léku D bude vypadat následovně:

$$\begin{aligned} \frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\ \frac{dI}{dt} &= \beta TV - aI, \\ \frac{dV}{dt} &= pI - u \left(1 + \frac{E_{max}D^\gamma}{ED_{50}^\gamma + D^\gamma} \right) V, \\ \frac{dD}{dt} &= c - eD. \end{aligned} \quad (5.7)$$

Opět budu uvažovat také potřebu aktivace prekurzoru enzymem a soustavu (5.7) rozšířím o rovnice pro prekurzor L , enzym E a komplex prekurzor-enzym C . Soustavu opět zjednoduším uva-

žováním kinetiky Michaelise-Mentenové a získám následující soustavu:

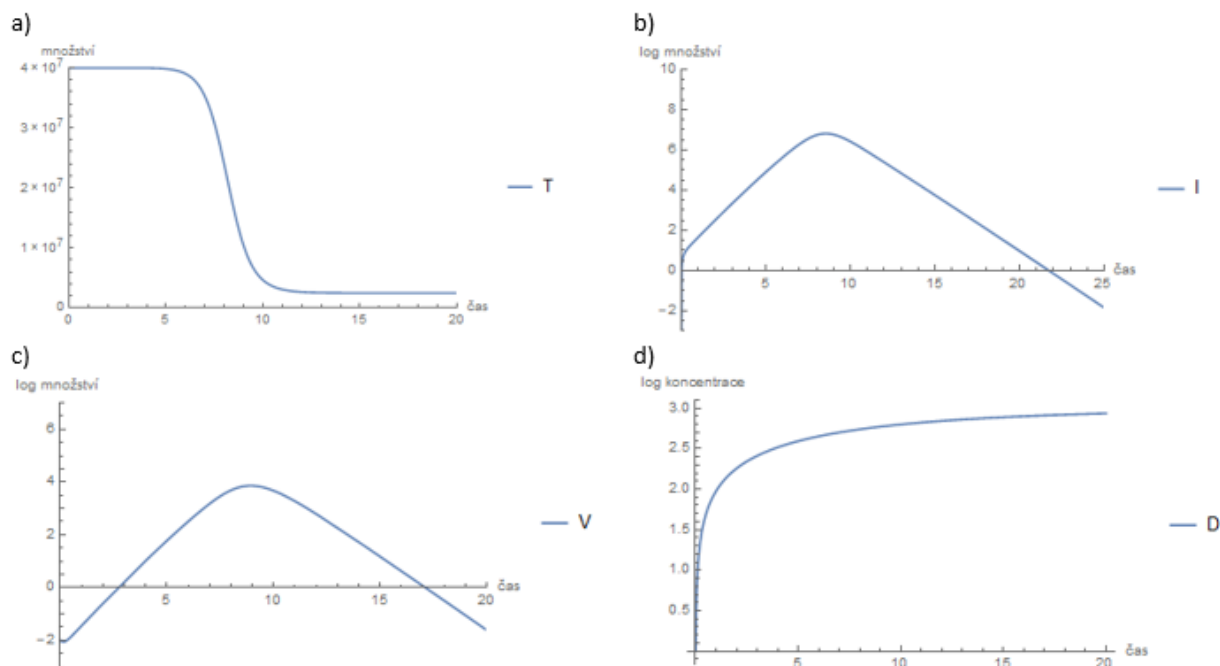
$$\begin{aligned}
 \frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\
 \frac{dI}{dt} &= \beta TV - aI, \\
 \frac{dV}{dt} &= pI - u \left(1 + \frac{E_{max} D^\gamma}{ED_{50}^\gamma + D^\gamma} \right) V, \\
 \frac{dD}{dt} &= \frac{ge_0 Lk}{gL + q + k} - eD, \\
 \frac{dL}{dt} &= c - \frac{ge_0 Lk}{gL + q + k}.
 \end{aligned} \tag{5.8}$$

Dále studuji jednotlivé modely (5.2) a (5.6) - (5.8). Provádím jejich částečnou exaktní analýzu a částečně numerické simulace. Simulace těchto modelů provádím v programu Wolfram Mathematica 10.0. Pro řešení soustav diferenciálních rovnic používám příkaz NDSolve a pro grafické znázornění řešení pak příkaz Plot. Simulovala jsem situaci bez léku, které odpovídá nastavení parametrů $c = 0$ a $ED_{50} > 0$, dále různý vliv koncentrací léku ($c > 0$ a $ED_{50} > 0$) a nakonec situaci, kdy je účinek léku po celou dobu maximální, což odpovídá parametrům $c > 0$ a $ED_{50} = 0$. Hodnoty ostatních parametrů, pro něž byly simulace provedeny, jsou uvedeny v tabulce 5.1. Je třeba poznamenat, že hodnoty parametrů jsou čerpány z různých zdrojů, které se věnují jednotlivým submodelům modelů (5.6) a (5.8). Výsledky je tedy nutno brát pouze jako ilustrační a porovnávat je pouze relativně. Modely srovnávám na základě několika kvantitativních kritérií, sleduji maximální množství virionů přítomných v organismu během infekce a délku trvání této infekce, kterou definuji jako dobu, za kterou poklesne množství virionů pod jejich počáteční množství.

5.4 Výsledky

5.4.1 Analýza modelu (5.2)

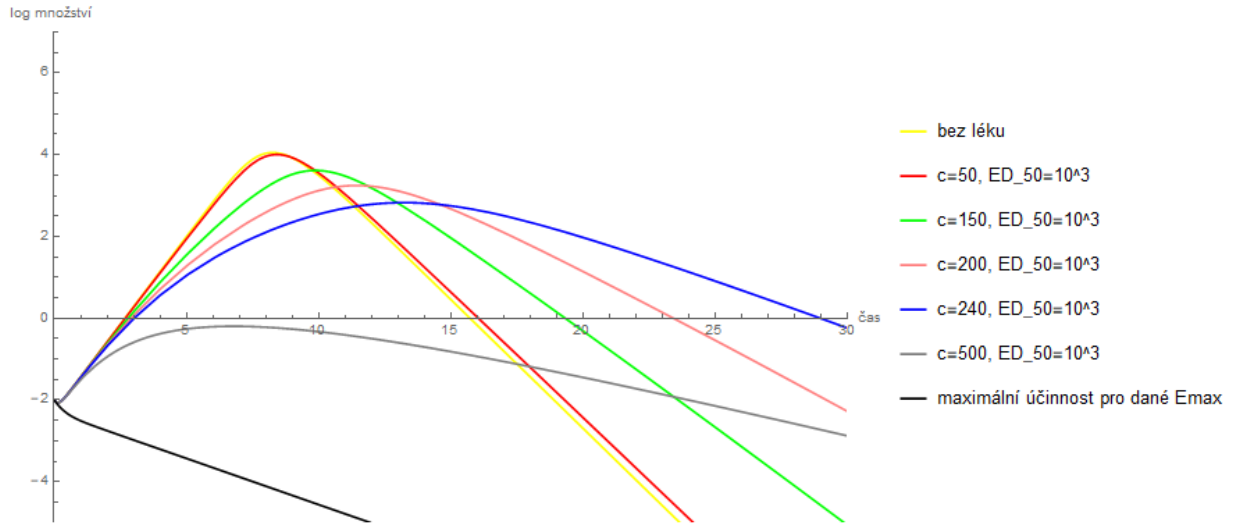
Na obrázku 5.2 vidíme časový průběh změn jednotlivých složek modelu (5.2). Na části a) vidíme, jak se mění množství zdravých buněk, můžeme si všimnout, že množství se po určité době



Obrázek 5.2: Časový průběh množství zdravých buněk (a), infikovaných buněk (b), virionů (c) a koncentrace léku (d) v modelu (5.2).

dostává do ekvilibria. Část b) tohoto obrázku představuje průběh množství infikovaných buněk při nemoci, vidíme, že přibližně do desátého dne nemoci jejich množství roste, poté začne klesat. Obrázek 5.2 c) znázorňuje změny v populaci virionů během infekce a obrázek 5.2 d) pak změny v koncentraci léku, které, jak ještě uvidíme, se limitně blíží ekvilibriu. Dále se zaměřím jen na časový průběh množství virionů za různých podmínek, neboť tato veličina se standardně měří v experimentech. V rámci analýzy modelu bych ráda popsala trendy, které můžeme vidět na obrázku 5.3. Tento obrázek ukazuje, jak se mění závislost množství virionů v organismu během infekce pro různé situace. Vidíme, že se zvyšující se rychlostí dodávání léku c klesá maximální množství virionů přítomných v organismu. Zpočátku dochází také ke zpoždění doby, kdy populace virionů nabývá maxima. Navíc se zpočátku prodlužuje doba léčby.

Podívejme se podrobněji na analýzu soustavy (5.2). Základní reprodukční číslo infekce R_0 je i v případě léčby stále stejné jako bez léčby, protože v čase $t = 0$ je $D = 0$. Proměnná D se časem nasytí na hodnotě $D^* = \frac{c}{e}$. Spočtěme nyní R_0 za předpokladu, že koncentrace léku je od



Obrázek 5.3: Průběh změn množství virionů během infekce za různých podmínek pro model (5.2).

počátku na hodnotě $D = D^* = \frac{c}{e}$. Dosadím tedy hodnotu $D^* = \frac{c}{e}$ do rovnice pro viriony V .

Získám soustavu

$$\begin{aligned} \frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\ \frac{dI}{dt} &= \beta TV - aI, \\ \frac{dV}{dt} &= pI \left(1 - \frac{E_{max}(c/e)^\gamma}{ED_{50}^\gamma + (c/e)^\gamma} \right) - uV. \end{aligned} \quad (5.9)$$

Pro obdobnou soustavu jsem již základní reprodukční číslo R_0 infekce určovala v kapitole 3, z toho také vyjdu. Protože člen v závorce v rovnici pro V je konstanta, základní reprodukční číslo infekce pro model (5.2) bude:

$$R_0 = \frac{p \left(1 - \frac{E_{max}(c/e)^\gamma}{ED_{50}^\gamma + (c/e)^\gamma} \right) \beta T_0}{au}, \quad (5.10)$$

kde T_0 je počáteční množství zdravých buněk. Nyní chci zjistit, za jakých podmínek nemoc nepropukne, to znamená, kdy bude platit $R_0 < 1$ neboli

$$\frac{p \left(1 - \frac{E_{max}(c/e)^\gamma}{ED_{50}^\gamma + (c/e)^\gamma} \right) \beta T_0}{au} < 1. \quad (5.11)$$

Postupnými úpravami zjistím podmínku pro c :

$$\begin{aligned}
 p \left(1 - \frac{E_{max}(c/e)^\gamma}{ED_{50}^\gamma + (c/e)^\gamma} \right) \beta T_0 &< au, \\
 1 - \frac{E_{max}(c/e)^\gamma}{ED_{50}^\gamma + (c/e)^\gamma} &< \frac{au}{p\beta T_0}, \\
 1 - \frac{au}{p\beta T_0} &< \frac{E_{max}(c/e)^\gamma}{ED_{50}^\gamma + (c/e)^\gamma}, \\
 ED_{50}^\gamma \left(1 - \frac{au}{p\beta T_0} \right) + \left(\frac{c}{e} \right)^\gamma \left(1 - \frac{au}{p\beta T_0} \right) &< E_{max} \left(\frac{c}{e} \right)^\gamma, \\
 ED_{50}^\gamma \left(1 - \frac{au}{p\beta T_0} \right) &< \left(E_{max} - 1 + \frac{au}{p\beta T_0} \right) \left(\frac{c}{e} \right)^\gamma.
 \end{aligned}$$

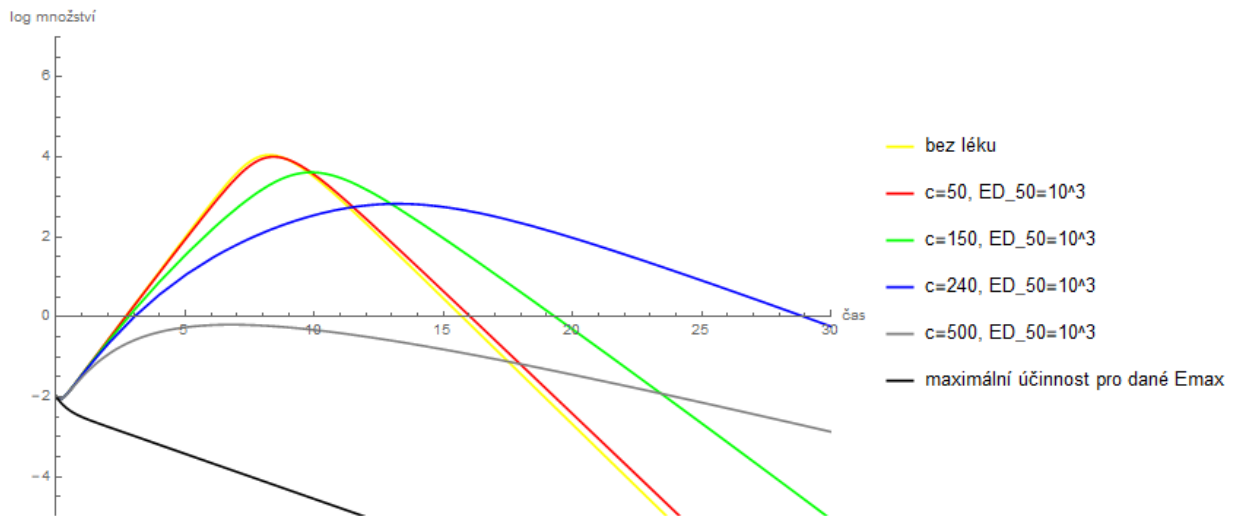
Předpokládám, že $\frac{p\beta T_0}{au} > 1$, neboť předpokládám, že bez působení léku se infekce bude šířit. Je-li $E_{max} < 1 - \frac{au}{p\beta T_0}$, není možné tuto nerovnici pro žádné c splnit a není tak možné snížit R_0 pod hodnotu 1. Naopak, je-li $E_{max} > 1 - \frac{au}{p\beta T_0}$, dostávám

$$\frac{c}{e} > ED_{50} \left[\frac{\left(1 - \frac{au}{p\beta T_0} \right)}{\left(E_{max} - 1 + \frac{au}{p\beta T_0} \right)} \right]^{1/\gamma}.$$

Zajímá mě nyní, pro jakou hodnotu c se nebude nemoc šířit. Dosadím proto hodnoty z tabulky 5.1, které jsem využila při simulacích. Získávám tak podmínku $c > 252.78$. Ve skutečnosti se však infekce bude zpočátku šířit pro jakoukoliv hodnotu c , tato hodnota však bude ovlivňovat průběh nemoci, jak ukazuje obr. 5.3.

5.4.2 Analýza modelu (5.6)

Podívejme se, jak se změní výsledky, pokud léčba nebude přímá, ale bude zprostředkována enzymem. Výsledky modelu (5.6) jsou zakresleny v obrázku 5.4. Porovnejme obrázky 5.3 a 5.4. Vidíme, že jsou téměř shodné, můžeme tedy říci, že pro zvolené parametry nemá potřeba aktivace léku enzymem na léčbu příliš velký vliv. Toto tvrzení podpoříme podobným výpočtem jako v části 5.4.1.



Obrázek 5.4: Průběh změn množství virionů během infekce za různých podmínek pro model (5.6).

Opět se podíváme na analýzu modelu, hledám hodnotu L v ekvilibriu, to znamená, že řeším, kdy je poslední rovnice systému (5.6) rovna nule:

$$c - \frac{ge_0L^*k}{gL^* + q + k} = 0,$$

$$cgL^* + c(q + k) = ge_0L^*k,$$

$$L^*(ge_0k - cg) = c(q + k),$$

$$L^* = \frac{c(q + k)}{g(e_0k - c)}.$$

Pokud bude $e_0k > c$, pak bude platit $L^* > 0$ a L^* tak bude ekvilibrium. V případě, že platí $e_0k < c$, přepíšeme původní rovnici do tvaru:

$$c - \frac{gL^*}{gL^* + q + k}e_0k = 0,$$

Tato rovnice nemůže být pro $e_0k < c$ splněna pro žádné L^* a proto $L^* \rightarrow \infty$. Nyní spočítám hodnotu D v ekvilibriu, opět řeším, kdy je pravá strana rovnice popisující změny v koncentraci

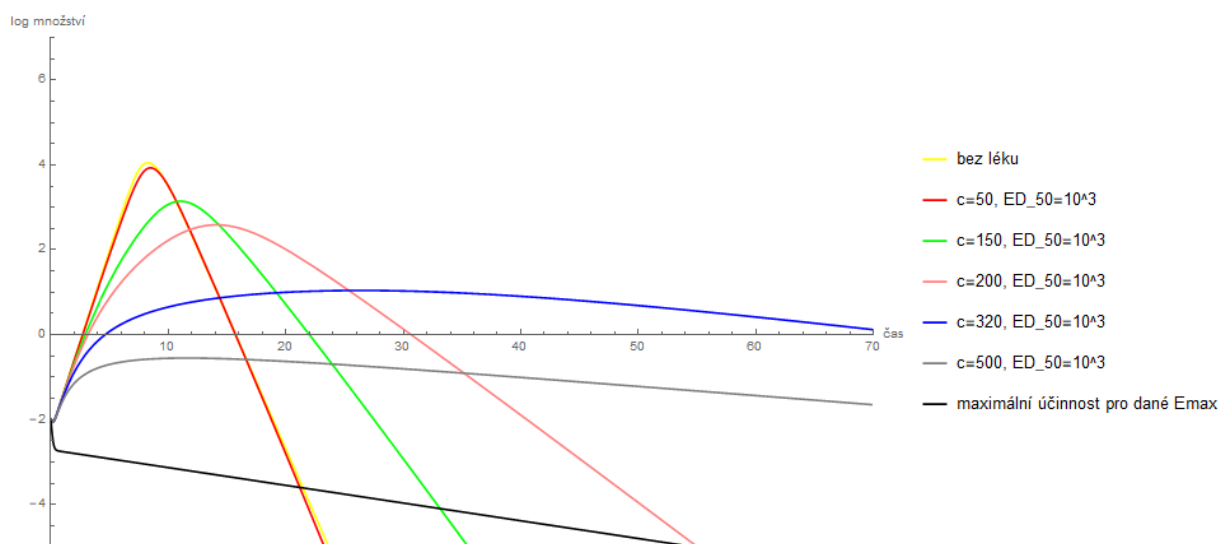
léku rovna nule, za L dosadím hodnotu v ekvilibriu L^* :

$$\frac{ge_0L^*k}{gL^* + q + k} - eD^* = 0,$$

$$D^* = \frac{ge_0L^*k}{(gL^* + q + k)e}.$$

Pokud bude platit $e_0k > c$, pak bude pro ekvilibrium platit $D^* = \frac{c}{e}$. V opačném případě, tedy pro $e_0k < c$, bude ekvilibrium tvaru $D^* = \frac{e_0k}{e}$. Ekvilibrium tak bude minimem z obou hodnot, čímž je pro použité parametry a použitý rozsah c hodnota $D^* = \frac{c}{e}$. Základní reprodukční číslo infekce R_0 tak má vzhledem k tvaru ekvilibríu stejný tvar jako v případě modelu (5.2).

5.4.3 Analýza modelu (5.7)



Obrázek 5.5: Průběh změn množství virionů během infekce za různých podmínek pro model (5.7).

Podívejme se na obrázek 5.5, který zobrazuje závislost množství virionů na čase pro různé podmínky v případě, že lék, který dodáváme přímo, zvyšuje mortalitu virionů, a popišme si, co vidíme. Se zvyšující se rychlostí dodávání léku klesá maximum, kterého množství virionů v krvi nabývá, ale opět se zpočátku výrazně prodlužuje doba infekce. Pokud bychom porovnali obrázky 5.3 a 5.5, vidíme, že modely se chovají kvalitativně stejně, pozorujeme stejné trendy.

Odvoďme si nyní, stejně jako pro předchozí modely, základní reprodukční číslo infekce R_0 pro model (5.7). Předpokládám, že koncentrace léku D je od počátku konstantní, tedy že $D = D^* = \frac{c}{e}$. Tuto hodnotu dosadím do rovnice pro V a získám tak soustavu:

$$\begin{aligned}\frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\ \frac{dI}{dt} &= \beta TV - aI, \\ \frac{dV}{dt} &= pI - \left(1 + \frac{E_{max}(c/e)^\gamma}{ED_{50}^\gamma + (c/e)^\gamma}\right) uV.\end{aligned}\tag{5.12}$$

Tvar základního reprodukčního čísla infekce jsem již odvodila v kapitole 3, pro model (5.7) bude mít tvar (výraz v závorce v rovnici pro V je opět konstanta):

$$R_0 = \frac{p\beta T_0}{au \left(1 + \frac{E_{max}(c/e)^\gamma}{ED_{50}^\gamma + (c/e)^\gamma}\right)}.\tag{5.13}$$

Chci zjistit, za jakých podmínek se nebude infekce šířit, položím tedy R_0 menší jedné a určím podmínku pro c :

$$\begin{aligned}\frac{p\beta T_0}{au \left(1 + \frac{E_{max}(c/e)^\gamma}{ED_{50}^\gamma + (c/e)^\gamma}\right)} &< 1, \\ \frac{p\beta T_0}{au} - 1 &< \frac{E_{max}(c/e)^\gamma}{ED_{50}^\gamma + (c/e)^\gamma}, \\ ED_{50}^\gamma \left(\frac{p\beta T_0}{au} - 1\right) &< \left(\frac{c}{e}\right)^\gamma \left(E_{max} - \frac{p\beta T_0}{au} + 1\right),\end{aligned}$$

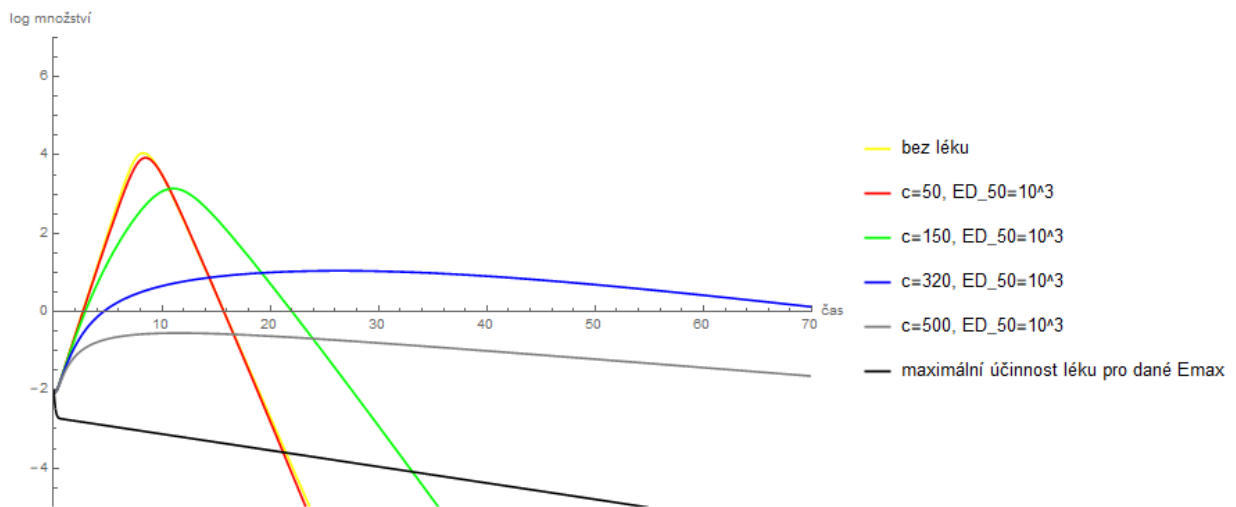
Opět předpokládám, že výraz $\frac{p\beta T_0}{au}$ je větší než jedna, protože předpokládám, že pokud infekci neléčíme, šíří se. Pokud platí $E_{max} < \frac{p\beta T_0}{au} - 1$, není možné nerovnici pro žádné $c > 0$ splnit a infekce se bude šířit pro všechna c . Naopak, pokud $E_{max} > \frac{p\beta T_0}{au} - 1$, můžu najít takovou hodnotu $c > 0$, kdy bude platit $R_0 < 1$. Dostávám tedy

$$\frac{c}{e} > ED_{50} \left[\frac{p\beta T_0 - au}{au(E_{max} + 1) - p\beta T_0} \right]^{1/\gamma}.$$

Do poslední nerovnice dosadím hodnoty z tabulky 5.1 a zjistím, jaká musí být minimální hodnota c , aby nepropukla infekce. Získávám tak podmínku $c > 349.71$.

5.4.4 Analýza modelu (5.8)

Ukažme si, jak se změní výsledky, pokud budu uvažovat nepřímou léčbu a lék budu tedy aktivovat enzymem. Výsledky modelu (5.8) jsou představeny na obrázku 5.6. Porovnáním obrázků 5.5 a 5.6 zjistíme, že pro námi zvolené parametry není velký rozdíl mezi léčbou přímou a léčbou zprostředkovanou enzymem.



Obrázek 5.6: Průběh změn množství virionů během infekce za různých podmínek pro model (5.8).

Hledám nyní hodnotu L v ekvilibriu, řeším tedy, kdy je poslední rovnice systému (5.8) rovna nule.

$$c - \frac{ge_0Lk}{gL + q + k} = 0,$$

$$cgL^* + c(q + k) = ge_0L^*k,$$

$$L^*(ge_0k - cg) = c(q + k),$$

$$L^* = \frac{c(q + k)}{g(e_0k - c)}.$$

Pro určení hodnoty ekvilibria zapíši původní rovnici ve tvaru

$$c - \frac{gL^*}{gL^* + q + k}e_0k = 0. \tag{5.14}$$

Pokud bude platit $e_0k > c$, bude ekvilibrium rovno hodnotě množství prekursoru $L = L^*$, v opačném případě, tj. pro $e_0k < c$, nelze rovnici (5.14) vyřešit a platí $L^* \rightarrow \infty$. Nyní určím hodnotu D v ekvilibriu. Do rovnice pro proměnnou D systému (5.8) dosadím za L hodnotu v ekvilibriu L^* a pravou stranu této rovnice položíím rovnou nule. Získám:

$$\frac{ge_0L^*k}{gL^* + q + k} - eD^* = 0,$$

$$D^* = \frac{ge_0L^*k}{(gL^* + q + k)e}.$$

Pro ekvilibrium platí $D^* = \frac{c}{e}$, pokud $e_0k > c$. V případě, že $e_0k < c$, je ekvilibrium tvaru $D^* = \frac{e_0k}{e}$. Ekvilibrium je minimem z obou hodnot, což je pro naše parametry $D^* = \frac{c}{e}$. Základní reprodukční číslo infekce modelu (5.8) tak bude stejného tvaru jako v případě modelu (5.7). I z tohoto pohledu není pro námi zvolené parametry rozdíl mezi přímou a zprostředkovanou léčbou.

5.5 Diskuze

Vytvořila jsem několik komplexních modelů, které zahrnují infekci a její léčbu, a to lékem nebo prekuzorem, ze kterého se reakcí s enzymem stává účinná látka. Modely se neliší pouze ve způsobu podání léku, ale také v mechanismu účinku tohoto léku. Simulovala jsem lék, který snižuje produkci virionů infikovanými buňkami, a dále pak lék, který zvyšuje mortalitu virionů. Sledovala jsem, jakým způsobem se mění množství virionů přítomných během nemoci v organismu pro různé rychlosti dodávání léku.

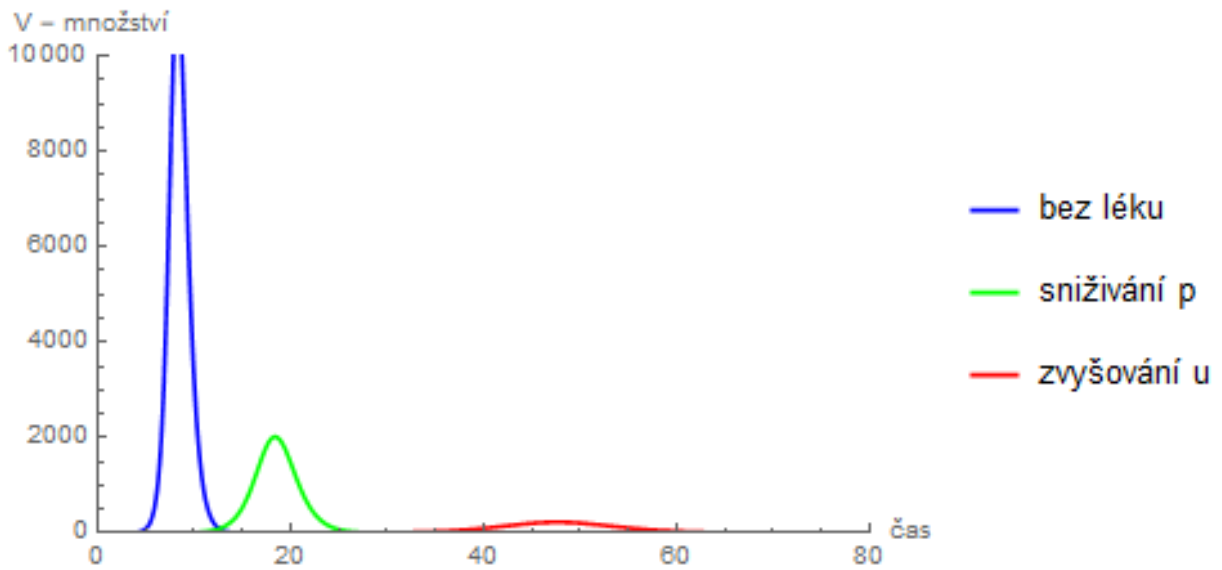
Ukázalo se, že pro zvolené parametry převzaté z literatury není rozdíl mezi léčbou přímou a léčbou zprostředkovanou enzymem. Provedla jsem analýzu všech čtyř modelů a určila minimální rychlost dodávání léku c . Pokud bude tato rychlost vyšší, nemoc nepropukne za předpokladu, že množství dodaného léku je od počátku na hodnotě $D = D^*$. Pro modely, kde lék snižuje produkci virionů je tento odhad $c = 252.78$, pro modely, kde uvažuji, že lék zvyšuje mortalitu virionů, je toto číslo $c = 349.71$. U obou modelů jsem pozorovala, že s vyšší rychlostí c klesá maximální množství virionů v krvi, ale prodlužuje se délka nemoci, v této kapitole definované jako doba, za kterou klesne množství virionů pod jejich počáteční úroveň. Výrazněji je tento trend vidět u modelu, kde lék zvyšuje mortalitu virionů.

Je zřejmé, že vždy se nedá lék do organismu dodávat kontinuálně. Tudíž ne každá nemoc se dá modelovat mými modely. Také je třeba zmínit, že hodnoty parametrů, které jsem pro simulace zvolila, jsem čerpala z více zdrojů. Pro konkrétní aplikace mých modelů by tedy bylo nutné získat všechny parametry z celkového systému, případně modely vhodným způsobem rozšířit. Můžeme využít rovnic představených v předchozích kapitolách, například můžeme uvažovat působení léčivé látky na zdravé buňky za vzniku buněk dočasně odolných vůči infekci. Necht' tyto rezistentní buňky R vznikají s rychlostí b a opět se stávají náchylnými k infekci s rychlostí r . Například model (5.6) se pak změní takto:

$$\begin{aligned}
 \frac{dT}{dt} &= -\beta TV - bTD + rR, \\
 \frac{dI}{dt} &= \beta TV - aI, \\
 \frac{dV}{dt} &= p \left(1 - \frac{E_{max} D^\gamma}{ED_{50}^\gamma + D^\gamma} \right) I - uV, \\
 \frac{dD}{dt} &= \frac{ge_0 Lk}{gL + q + k} - eD, \\
 \frac{dL}{dt} &= c - \frac{gL e_0 k}{gL + q + k} \\
 \frac{dR}{dt} &= -rR + bTD.
 \end{aligned} \tag{5.15}$$

Představila jsem čtyři modely, které uvažují léčbu infekce lékem či prekurzorem léku s různým mechanismem působení. Zjistila jsem, že typ léku se odvíjí od druhu nemoci. Vždy dochází ke snížení maximálního množství virionů, výraznější je tento pokles pokud použijeme lék zvyšující mortalitu virionů. Naopak pokud aplikujeme lék, který snižuje produkci virionů, nedochází k tak výraznému prodloužení doby léčby, jako v případě druhého typu léku.

Z mnou uvedených obrázků se možná na první pohled může zdát, že lék nefunguje. Ukažme si tedy ještě na závěr, jiné vykreslení situace bez léku a s oběma typy léku. Pro demonstraci nám postačí model (5.1). Snižování parametru p odpovídá situaci, kdy nemoc léčíme lékem snižujícím produkci virionů. Naopak zvyšování parametru u odpovídá dodávání léku, který zvyšuje mortalitu virionů. Nejprve se podívejme na průběh změn množství virionů (obr. 5.7) bez léku (modrá křivka). Vidíme, že dochází k rychlému nástupu nemoci. Dále vidíme, že maximum množství



Obrázek 5.7: Průběh změn množství virionů během infekce za různých podmínek pro model (5.1).

virionů je velmi vysoké, nemoc je tedy velmi intenzivní, z osy x můžeme vyčíst, že ale netrvá příliš dlouho. Pokud do těla dodáme lék snižující produkci virionů (zelená křivka), vidíme, že k nástupu nemoci dochází později a také není tak intenzivní. Mírně se prodlužuje doba léčby. Poslední křivka (červená) na obrázku představuje situaci, kdy nemoc léčíme lékem, který zvyšuje mortalitu virionů. Vidíme, že nemoc je v tomto případě nejméně intenzivní, zato trvá nejdelší dobu, než se jedinec uzdraví. Vždy je tedy třeba uvážit, zda je vhodnější zkrátit dobu nemoci nebo snížit její intenzitu.

Parametr	Význam	Hodnota	Jednotka
T_0	počáteční množství zdravých buněk	$4 \cdot 10^7$	–
V_0	počáteční množství virionů	10^{-2}	TCID ₅₀ /objem
e_0	konstatní koncentrace enzymu	10^5	mol/objem
D_0	počáteční koncentrace léku	0	mol/objem
β	rychlost infekce	$1.3 \cdot 10^{-4}$	(TCID ₅₀ /objem) ⁻¹ čas ⁻¹
a	rychlost zániku infikovaných buněk	2.1	čas ⁻¹
p	rychlost vzniku virionů	$3.2 \cdot 10^{-3}$	(TCID ₅₀ /objem) čas ⁻¹
u	rychlost zániku virionů	2.1	čas ⁻¹
c	rychlost kontinuálního dodávání léku (prekurzoru)	0 až 320	(mol/objem) čas ⁻¹
g	rychlostní konstanta reakce léku s enzymem	0.1	čas ⁻¹
q	rychlostní konstanta rozpadu komplexu prekurzor-enzym na výchozí látky	10^2	čas ⁻¹
k	rychlostní konstanta rozpadu komplexu prekurzor-enzym na lék a enzym	10^5	čas ⁻¹
e	rychlost degradace léku v krvi	0.1	čas ⁻¹
E_{max}	maximální účinek léku (pro lék potlačující produkci virionů; pro lék zvyšující mortalitu virionů)	0.85; 3	–
γ	Hillův koeficient	2	–
ED_{50}	koncentrace léku, při které je dosaženo poloviny maximálního účinku	0; 10^3	mol/objem

Tabulka 5.1: Přehled parametrů použitých v simulacích modelů (5.2) a (5.6) - (5.8), hodnoty čerpány z [1, 12].

Kapitola 6

Závěr

V diplomové práci jsem se zabývala matematickými modely popisujícími procesy, které probíhají na buněčné úrovni. První tři kapitoly práce popisují matematické modelování kinetiky enzymatických reakcí, dynamiky virové infekce a modely farmakokinetickodynamické. V rámci každé z těchto kapitol je popsán základní model a následně uvádím některá jeho rozšíření. Dále jsem na závěr každé kapitoly zařadila nějaké aktuální studie, abych demonstrovala, že i když jsou základní modely známé řadu let, stále jsou aktuální.

V závěrečné kapitole práce jsem vytvořila vlastní řadu modelů, které propojují všechny tři studované oblasti. Do těla je vpraven lék či jeho prekurzor, který se aktivuje enzymem, a následně působí na infikované buňky. Provedla jsem analýzy modelů s rozdílným působením léku. Uvažovala jsem lék, který snižuje produkci virionů, a lék zvyšující jejich mortalitu. Výsledky ukázaly, že u obou typů léku dochází ke snížení maximálního množství virionů, výraznější je tento pokles u léku zvyšujícího mortalitu virionů. Při použití léku, který snižuje produkci virionů, nedochází k tak výraznému prodloužení doby léčby jako v případě druhého typu léku. Před léčbou je tedy třeba uvažovat, jaké jsou priority, zda výraznější snížení množství virionů či zkrácení doby infekce.

Hlavní přínos mé diplomové práce vidím v tom, že tvoří ucelený a obsáhlý přehled modelů ve vybraných oblastech. Myslím, že může být zajímavá nejen pro matematiky, ale i pro biology či chemiky, může sloužit jako studijní materiál pro matematicko-biologické semináře. První cíl

se tedy podařilo naplnit. Co se týče druhého cíle, modely jsem vytvořila, představila jsem myšlenkové pochody, které vedly k jejich vytvoření a analyzovala jsem je. Představené modely by se daly rozšířit mnoha dalšími směry, například uvažováním doby latence u infikovaných buněk či možnou reakcí nějakého aktivátoru či inhibitoru s enzymem.

Literatura

- [1] Baccam, P., C. Beauchemin, C. A. Macken, H. F. G. and A. S. Perelson. 2006. Kinetics of influenza a virus infection in humans. *Journal of Virology* 80:7590–7599.
- [2] Boianelli, A., V. K. Nguyen, T. Ebbesen, K. Schulze, E. Wilk, N. Sharma, S. Stegemann-Koniszewski, D. Bruder, F. R. Toapanta, C. A. Guzmán, M. Meyer-Hermann and E. A. Hernandez-Vargas. 2015. Modeling influenza virus infection: a roadmap for influenza research. *Viruses* 7:5274–5304.
- [3] Bonhoeffer, S., R. M. May, G. M. Shaw and M. A. Nowak. 1997. Virus dynamics and drug therapy. *Medical Science* 94:6971–6976.
- [4] Cain, J. W. 2014. Chemical reaction kinetics: mathematical underpinnings. *Molecular Life Sciences*.
- [5] Canini, L., E. J. Woolhouse, Mark, R. Maines, Taronna and F. Carrat. 2016. Heterogeneous shedding of influenza by human subjects and its implication for epidemiology and control. *Scientific Reports* 6:38749.
- [6] Cheng, Y.-H., S.-H. You, C. S.-C. Lin, Yi-Jun, W.-Y. Chen, W.-C. Chou, N.-H. Hsieh and C.-M. Liao. 2017. Mathematical modeling of postcoinfection with influenza A virus and *Streptococcus pneumoniae*, with implication for pneumonia and COPD-risk assessment. *International Journal of COPD* 12:1973–1988.
- [7] Higham, D. J. 2008. Modeling and simulating chemical reaction. *SIAM Review* 50:347–368.

- [8] Klipp, E., R. Herwig, A. Kowald, C. Wierling and H. Lehrach. 2005. *Systems biology in practice: concepts, implementation and application*. Weinheim: Wiley-Vch.
- [9] Macheras, P. and A. Iliadis. 2006. *Modeling in biopharmaceutics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics: homogeneous and heterogeneous approaches*. New York: Springer.
- [10] McKenna, M. T., J. A. Weis, S. L. Barnes, D. R. Tyson, M. I. Miga, V. Quaranta and T. E. Yankeelov. 2017. A predictive mathematical modeling approach for the study of doxorubicin treatment in triple negative breast cancer. *Scientific reports* 7:5725.
- [11] Murray, J. D. 2003. *Mathematical biology*. New York: Springer.
- [12] Nielsen, E. I. and L. E. Friberg. 2013. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacological Reviews* 65:1053–1090.
- [13] Nowak, M. A. and M. Bangham, Charles R. 1996. Population dynamics of immune responses to persistent viruses. *Science* 272:74–79.
- [14] Šípal, Z., P. Anzenbacher, P. Peč, J. Pospíšil and I. Růžička. 1992. *Biochemie*. Státní pedagogické nakladatelství Praha.
- [15] Pawelek, K. A., G. T. Huynh, M. Quinlivan, A. Cullinane, L. Rong and A. S. Perelson. 2012. Modeling within-host dynamics of influenza virus infection including immune responses. *PLoS Computation Biology* 8:e1002588.
- [16] Perelson, A. S. 2002. Modeling viral and immune system dynamics. *Nature Reviews Immunology* 2:28–36.
- [17] Perelson, A. S., A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard and H. D. David. 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271:1582–1586.
- [18] Pinheiro, K. H., L. Brunelli do Nascimento, V. C. Fenelon, C. E. Barao, G. Matioli and F. Faria de Moraes. 2017. Mathematical modelling and kinetic study for CD production

catalysed by Toruzyme[®] and CGTase from *Bacillus firmus* stain 37. *Bioprocess Biosyst* 40:1305–1316.

- [19] Saenz, R. A., M. Quinlivan, D. Elton, S. MacRae, A. S. Blunden, J. A. Mumford, J. M. Daly, P. Digard, A. Cullinane, B. T. Grenfell, J. W. McCauley, J. L. N. Wood and J. R. Gog. 2010. Dynamics of influenza virus infection and pathology. *Journal of Virology* 84:3974–3983.
- [20] Shadbahr, J., F. Khan and Y. Zhang. 2017. Kinetic modeling and dynamic analysis of simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to bioethanol. *Energy Conversion and Management* 141:236–243.
- [21] Vu, T., P. Ma, S. Chenm Jiyun, J. Hoon, A. V. Hecken, L. Yan, S. Wu, Liviawati, L. Hamilton and G. Vargas. 2017. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of erenumab (AMG 334) and capsaicin-induced dermal blood flow in healthy and migraine subjects. *Pharmaceutical Research* 34:1784–1795.

Kapitola 7

Přílohy

Seznam příloh

Příloha č. 1 - Ekvilibria systému (3.1)

Příloha č. 2 - Základní reprodukční číslo R_0 infekce popsané modelem (3.1)

Příloha č. 3 - Odvození vzorce (3.8)

Příloha 1 - Ekvilibria systému (3.1)

Pro určení ekvilibrií systému (3.1) postupujeme následovně. Právě strany jednotlivých rovnic položíme rovny nule

$$\begin{aligned}0 &= \lambda - dT - \beta VT, \\0 &= \beta VT - aI, \\0 &= kI - uV.\end{aligned}\tag{7.1}$$

Z druhé rovnice (7.1) vyjádříme neznámou I

$$I = \frac{\beta VT}{a}$$

a dosadíme do třetí rovnice (7.1)

$$\frac{k\beta VT}{a} - uV = 0.$$

Výslednou rovnici můžeme upravit na následující tvar

$$V \left(\frac{k\beta T}{a} - u \right) = 0.$$

Toto může nastat, pokud bude platit buď $T = \frac{au}{\beta k}$ nebo $V = 0$. Vyšetříme tedy oba případy. Nejprve se podíváme, jak bude vypadat ekvilibrum, pokud bude platit $T = \frac{au}{\beta k}$. Do první rovnice (7.1) dosadíme za T a získáme hodnotu V v ekvilibriu

$$\lambda - d \frac{au}{\beta k} - V \frac{au}{k} = 0,$$

$$V = \frac{k\lambda}{au} - \frac{d}{\beta}.$$

Nakonec do vyjádření pro I dosadíme za T a V , čímž získáme hodnotu I v ekvilibriu

$$I = \frac{\beta \left(\frac{k\lambda}{au} - \frac{d}{\beta} \right) \frac{au}{\beta k}}{a},$$

upravíme a dostaneme

$$I = \frac{\lambda}{a} - \frac{du}{\beta k}.$$

Získali jsme ekvilibrum

$$T_1^* = \frac{au}{k\beta},$$

$$I_1^* = \frac{\lambda}{a} - \frac{du}{k\beta},$$

$$V_1^* = \frac{\lambda k}{au} - \frac{d}{\beta}.$$

V druhém případě ($V = 0$) budeme ekvilibrum počítat následovně. Do první rovnice (7.1) dosadíme za V , čímž získáme řešení pro T

$$T = \frac{\lambda}{d}.$$

Do vyjádření pro neznámou I dosadíme za V a T spočítané hodnoty a dostaneme hodnotu I v ekvilibriu

$$I = 0.$$

Pro druhé ekvilibrium tedy platí

$$T_2^* = \frac{\lambda}{d},$$

$$I_2^* = 0,$$

$$V_2^* = 0.$$

Příloha 2 - Odvození základního reprodukčního čísla infekce popsané modelem (3.1)

Základní reprodukční číslo R_0 infekce lze určit tak, že najdeme ekvilibrium bez infekce soustavy (3.1) a vyřešíme jeho stabilitu. Nejprve sestavíme Jacobiho matici pro tuto soustavu:

$$J = \begin{pmatrix} -d - \beta V & 0 & -\beta T \\ \beta V & -a & \beta T \\ 0 & k & -u \end{pmatrix},$$

do které dosadíme hodnoty ekvilibria bez infekce $T^* = \frac{\lambda}{d}, V^* = 0, I^* = 0$. Získáme tak matici

$$J = \begin{pmatrix} -d & 0 & -\beta \frac{\lambda}{d} \\ 0 & -a & \beta \frac{\lambda}{d} \\ 0 & k & -u \end{pmatrix}.$$

Abychom mohli vyšetřit stabilitu ekvilibria bez infekce, musíme určit vlastní čísla této matice. Matice je téměř horní trojúhelníková, vhodnou úpravou ji převedeme na horní trojúhelníkovou matici s vlastními čísly na diagonále. Druhý řádek vynásobíme $\frac{k}{a}$ a přičteme k poslednímu řádku.

$$J = \begin{pmatrix} -d & 0 & -\beta \frac{\lambda}{d} \\ 0 & -a & \beta \frac{\lambda}{d} \\ 0 & 0 & \frac{\beta k \lambda}{ad} - u \end{pmatrix}.$$

Vlastní čísla jsou $\lambda_1 = -d, \lambda_2 = -a, \lambda_3 = \frac{\beta k \lambda}{ad} - u$. První dvě jsou záporná, potřebujeme vyšetřit znaménko toho třetího. Pokud bude platit $\lambda_3 < 0$, bude ekvilibrium stabilní, v případě, že bude platit $\lambda_3 > 0$, bude ekvilibrium nestabilní. Budeme řešit nerovnici $\lambda_3 < 0$

$$\frac{\beta k \lambda}{ad} - u < 0.$$

Odtud plyne podmínka

$$\frac{k\beta\lambda}{uad} < 1.$$

Pokud tedy bude platit tato podmínka, ekvilibrium $T^* = \frac{\lambda}{d}$, $V^* = 0$, $I^* = 0$ bude stabilní a infekce se nebude dál šířit. V opačném případě se jedná o ekvilibrium nestabilní. Hodnota na levé straně této podmínky je pak základní reprodukční číslo R_0 infekce:

$$R_0 = \frac{k\beta\lambda}{uad}.$$

Odvození vzorce (3.8)

Chceme vyřešit následující soustavu:

$$\frac{dT}{dt} = \lambda - dT - (1 - \epsilon_{RT})\beta V_I T,$$

$$\frac{dI}{dt} = (1 - \epsilon_{RT})\beta V_I T - aI,$$

$$\frac{dV_I}{dt} = (1 - \epsilon_{PI})kI - uV_I,$$

$$\frac{dV_{NI}}{dt} = \epsilon_{PI}kI - uV_{NI}.$$

Za předpokladu, že $\epsilon_{PI} = 1$ a počet neinfikovaných buněk T zůstává neměnný, tzn. že T není funkce, ale konstanta. Za těchto podmínek se soustava zjednoduší na následující tvar:

$$\frac{dI}{dt} = (1 - \epsilon_{RT})\beta V_I T - aI,$$

$$\frac{dV_I}{dt} = -uV_I, \tag{7.2}$$

$$\frac{dV_{NI}}{dt} = kI - uV_{NI}.$$

Nejprve vyřešíme rovnici popisující změny v populaci virionů schopných infikovat buňku V_I

$$\frac{dV_I}{dt} = -uV_I,$$

$$V_I(t) = e^{-ut}c.$$

Uplatněním počáteční podmínky $V_I(0) = V_{I_0}$ vypočítáme konstantu c

$$V_{I_0} = e^{-u \cdot 0}c,$$

$$V_{I_0} = c.$$

Řešení pro V_I má tvar

$$V_I(t) = V_{I_0} e^{-ut}.$$

Nyní toto řešení dosadíme do první rovnice soustavy (7.2) a získáme diferenciální rovnici tvaru

$$\frac{dI}{dt} = (1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0} e^{-ut} - aI,$$

kteřou budeme řešit metodou variace konstant. Nejprve vyřešíme příslušnou homogenní úlohu

$$\begin{aligned}\frac{dI}{dt} &= -aI, \\ I_H(t) &= e^{-at}c.\end{aligned}$$

Nyní budeme uvažovat, že konstanta c je funkcí času

$$I(t) = e^{-at}c(t).$$

Obě strany rovnice zderivujeme

$$\frac{dI}{dt} = -ae^{-at}c(t) + e^{-at}\frac{dc}{dt}$$

a dosadíme do původní nehomogenní úlohy. Tím získáme rovnici

$$-ae^{-at}c(t) + e^{-at}\frac{dc}{dt} = (1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0} e^{-ut} - ae^{-at}c(t).$$

Upravíme a integrací určíme funkci $c(t)$

$$c(t) = (1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0} \frac{e^{t(a-u)}}{a-u} + c_1.$$

Obecné řešení pro funkci I má tedy tvar

$$I(t) = e^{-ut} \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a-u} + c_1 e^{-at}.$$

Konstantu c_1 určíme pomocí počáteční podmínky $I(0) = I_0$

$$c_1 = I_0 - \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a-u}.$$

Řešení I má tedy tvar

$$I(t) = e^{-ut} \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a-u} + e^{-at} I_0 - e^{-at} \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a-u}.$$

Nakonec určíme funkci V_{NI} , do poslední rovnice systému (7.2) dosadíme za I a získáme

$$\frac{dV_{NI}}{dt} = k \left(e^{-ut} \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} + e^{-at} I_0 - e^{-at} \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} \right) - uV_{NI}.$$

Tuto rovnici bude opět řešit metodou variace konstant, nejprve vyřešíme homogenní rovnici

$$\begin{aligned} \frac{dV_{NI}}{dt} &= -uV_{NI}, \\ V_{NI_H}(t) &= e^{-ut}c. \end{aligned}$$

Opět budeme uvažovat, že konstanta c je funkcí času

$$V_{NI}(t) = e^{-ut}c(t).$$

Obě strany řešení homogenní úlohy zderivujeme

$$\frac{dV_{NI}}{dt} = -ue^{-ut}c(t) + e^{-ut}\frac{dc}{dt}$$

a dosadíme do nehomogenní diferenciální rovnice pro funkci V_{NI} :

$$-ue^{-ut}c(t) + e^{-ut}\frac{dc}{dt} = k \left(e^{-ut} \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} + e^{-at} I_0 - e^{-at} \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} \right) - ue^{-ut}c(t).$$

Upravíme a určíme funkci $c(t)$

$$c(t) = kt \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} + k \left(I_0 - \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} \right) \frac{e^{t(u-a)}}{u - a} + c_2.$$

Obecné řešení pro funkci V_{NI} má pak tvar

$$V_{NI}(t) = e^{-ut}kt \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} + k \frac{e^{-at}}{u - a} \left(I_0 - \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} \right) + e^{-ut}c_2.$$

Pomocí počáteční podmínky $V_{NI}(0) = V_{NI_0}$ dopočítáme konstantu c_2

$$c_2 = V_{NI_0} - \frac{k}{u - a} \left(I_0 - \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} \right).$$

Do obecného řešení pro V_{NI} dosadíme za konstantu c_2 , upravíme a získáme řešení tvaru

$$V_{NI}(t) = e^{-ut}kt \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} + e^{-ut}V_{NI_0} + \left(I_0 - \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} \right) \left(\frac{k(e^{-at} - e^{-ut})}{u - a} \right).$$

Vzorec, který chceme odvodit, získáme sečtením řešení pro V_I a V_{NI} :

$$V(t) = e^{-ut}(V_{I_0} + V_{NI_0}) + e^{-ut}kt \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} + \left(I_0 - \frac{(1 - \epsilon_{RT})\beta TV_{I_0}}{a - u} \right) \left(\frac{k(e^{-at} - e^{-ut})}{u - a} \right).$$

Tento výsledný vzorec udává množství virionů v organismu v případě, že infekci léčíme. Všimněme si, že platí:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} V(t) = 0.$$