

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] - 73 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, 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 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, virus infections and mathematical models in pharmacology. One of its aims is reviews the basic models in the given areas and to introduce the reader to the specific fields. The other aim is then to develop a 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 11. 4. 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	13
2.4.1	Kompetitivní inhibice	14
2.4.2	Akompetitivní inhibice	15
2.4.3	Nekompetitivní inhibice	17
2.4.4	Kooperace	20
2.5	Aktuální výzkum v oblasti kinetiky enzymatických reakcí	22
3	Modelování virových infekcí	29
3.1	HIV	29
3.1.1	Rozšíření základního modelu HIV infekce	31
3.2	Chřipka	38
3.2.1	Rozšíření základního modelu infekce chřipky	39
3.3	Aktuální výzkum v modelování virových infekcí	44
4	Matematické modely ve farmakologii	49
4.1	Farmakokinetika	50

4.2	Farmakodynamika	52
4.3	Farmakokineticko-dynamické modely	54
4.3.1	Rozšíření základního modelu	56
4.4	Aktuální výzkum v oblasti modelování ve farmakologii	57
5	Vlastní model	62
6	Závěr	70

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, kinetiky virových infekcí a modelování v oblasti farmakologie. Práce si klade za cíl vytvořit přehled základních modelů používaných v těchto oblastech, který by se dal použít i na matematicko-biologickém semináři. Práce také poskytuje čtenáři případné informace o literatuře k dané problematice. Druhým cílem práce je vytvoření vlastního modelu, který uvedené oblasti propojí.

Práce je rozdělena do čtyř kapitol. V kapitole 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 výsledkům aktuálního 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.

Další kapitola práce představuje matematické modely v oblasti kinetiky virové infekce. Pro práci jsme si vybrali infekci HIV a chřipky. Pro obě onemocnění představujeme základní model a následně dvě rozšíření. V případě HIV infekce v rámci rozšíření uvažujeme nejprve činnost lymfocytů, poté uvádíme, jak se kinetika infekce změní za přítomnosti léků. U chřipkové infekce zavádíme pro bližší přiblížení skutečnosti určitou dobu latence. Ve druhém rozšíření pak uvažujeme přítomnost interferonů a populace buněk odolných vůči infekci. V závěru kapitoly si přiblížíme nové studie v této oblasti. První uvedená studie 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 kinetiky je nesporně 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 třetí 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 pochopit interakce léku s organismem, snáze díky nim pochopíme rozdílnost mezi jednotlivými pacienty a experimenty.

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

Poslední kapitola je věnována vývoji a popisu vytvořeného modelu, který propojuje všechny

tři předchozí oblasti. 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 dodáváno konstantní množství léku, na čas, kdy populace virionů v organismu dosáhne maxima. Dále zkoumáme vliv počáteční koncentrace léku na tento čas.

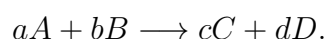
Kapitola 2

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 (Klipp et al., 2005). 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 ovlivní rychlost této reakce. Více informací o daném tématu může čtenář nalézt v literatuře (Murray, 2003; Higham, 2008; Cain, 2014; Klipp et al., 2005; Šípál et al., 1992). V poslední části kapitoly uvádíme představení dvou aktuálních výzkumů 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. Uvažujme obecnou chemickou reakci



Okamžitá rychlost takové reakce je definována následujícími vztahy

$$v = -\frac{1}{a} \cdot \frac{dn_A}{dt}, \quad v = -\frac{1}{b} \cdot \frac{dn_B}{dt}, \quad v = \frac{1}{c} \cdot \frac{dn_C}{dt}, \quad v = \frac{1}{d} \cdot \frac{dn_D}{dt},$$

kde n_X značí počet molů látky X . Okamžitá rychlost reakce je tak určena časovým úbytkem kterékoli výchozí látky, proto znaménko mínus, nebo též časovým přírůstkem jakéhokoli produktu reakce. Abychom mohli rychlost reakce vyjádřit pomocí kterékoli z přítomných látek, je třeba dělení stechiometrickým koeficientem.

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:

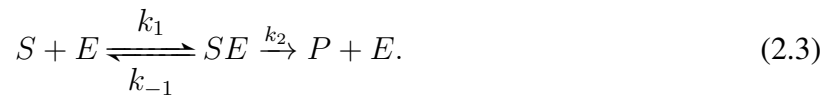
$$\begin{aligned} \frac{d[A]}{dt} &= -k_1[A][B] + k_{-1}[C], \\ \frac{d[B]}{dt} &= -k_1[A][B] + k_{-1}[C], \\ \frac{d[C]}{dt} &= 2k_1[A][B] - k_{-1}[C], \end{aligned} \quad (2.2)$$

kde $[X]$ značí koncentraci látky X . Jednotlivé rovnice popisují změnu množství (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 diferenciálních rovnic:

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

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

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

Vzhledem k systému (2.4) a podmínkám (2.5) vidíme, že rychlost reakce je funkcí času.

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

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

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:

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

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

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

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 $\frac{d[ES]}{dt} \approx 0$.

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

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

Konstanta K_m ve vztahu (2.10) se nazývá konstanta Michaelise-Mentenové, charakterizuje katalytické vlastnosti enzymu a je definována vztahem

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

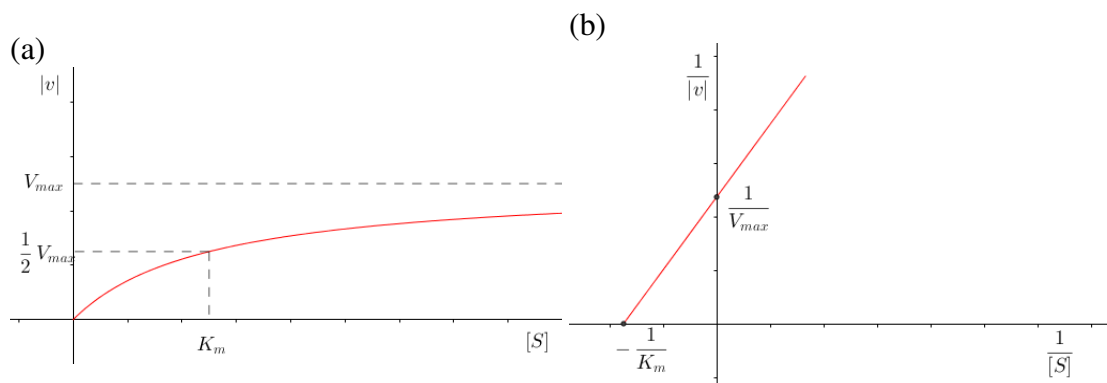
Po dosazení za $[ES]$ z výrazu (2.10) do první rovnice systému (2.8) dostáváme vzorec pro rychlost reakce z hlediska substrátu

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

kde V_{max} je maximální rychlost reakce a platí $V_{max} = k_2 e_0$. Tato aproximace je známa jako kvazi-rovnovážná a nazývá se též kinetika Michaelise-Mentenové (Murray, 2003). 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



Obrázek 2.1: Grafické vyjádření rychlosti enzymatické reakce (a) dle Michaelise-Mentenové (2.12) a (b) dle Lineweavera a Burka (2.14).

$[ES](0) = \frac{e_0[S](0)}{[S](0)+K_m}$. Jak uvidíme v následující části 2.2, řešení je dobrou aproximací dynamiky systému (2.8) nebo (2.12) 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. 2.1 a). 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 Lineweavera-Burka, která má následující tvar a jejímž grafickým znázorněním je přímka (obr. 2.1 b):

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

Z průsečíků takto získané přímky s 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 .

Zde končí většina klasických textů zaměřených na kinetiku enzymatických reakcí. Tyto texty často implicitně přepokládají, že dynamika reakce daná rovnicemi (2.10) a (2.13) je dostatečně dobrou aproximací skutečné dynamiky dané systémem (2.4). Předchozí úvahy nás však nutí položit si pár otázek. Jak rychlá je dynamika systému (2.4) poblíž $t = 0$? Pro jaké parametry je aproximace (2.10) a (2.13) dostatečně dobrá? A co máme dělat v situaci, kdy koncentrace enzymu není dostatečně malá oproti počáteční koncentraci substrátu? 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 (Murray, 2003). Pro analýzu kvazi-rovnovážného stavu musíme nejdříve zavést bezrozměrné veličiny a model přeparametrizovat s využitím například následujících vztahů (existuje více možných způsobů přeparametrizování):

$$\tau = k_1 e_0 t, \quad u(\tau) = \frac{[S](t)}{s_0}, \quad v(\tau) = \frac{[ES](t)}{e_0} \quad (2.15)$$

$$\lambda = \frac{k_2}{k_1 s_0}, \quad K = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 s_0} = \frac{K_m}{s_0}, \quad \varepsilon = \frac{e_0}{s_0}.$$

Přepíšme 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 $u = 1$. Protože pro malé τ je $\frac{dv}{d\tau} > 0$, proměnná v 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 dočinění s tzv. úlohou singulární perturbace. V okolí nuly rozvíňme řešení u a v do Taylorovy řady podle parametru ε v okolí bodu $\varepsilon = 0$:

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

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

Předpokládáme tak, že $u(\tau, \varepsilon)$ a $v(\tau, \varepsilon)$ jsou analytické funkce proměnné ε pro $\varepsilon \rightarrow 0$. 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 nespĺňuje 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 poznamenat, že toto řešení neplatí pro všechna $\tau \geq 0$, protože při výpočtu jsme neuvažovali počáteční podmínku $v_0(0) = 0$. Vzhledem k tomu, že systém (2.19) obsahuje pouze jednu integrační konstantu a to v rovnici pro proměnnou u , nemůžeme splnit obě počáteční podmínky (2.20) současně.

Protože řešení (2.23), konkrétně řešení pro v_0 , nespĺňuje počáteční podmínku, musíme konstatovat, že jedno z řešení $u(\tau, \varepsilon), v(\tau, \varepsilon)$ není analytickou funkcí proměnné ε pro $\varepsilon \rightarrow 0$. Z toho, že není splněna počáteční podmínka $v(0) = 0$, plyne, že musíme v modelu (2.16) ponechat člen ε , a tak je nezbytné pro další řešení 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:

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

Díky tomu, že systém (2.25) již neobsahuje malý parametr ε v rovnici pro V , můžeme řešení rozvinout 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 $U_1(\sigma)$ a $V_1(\sigma)$ a $u_1(\tau)$ a $v_1(\tau)$. 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 zanedbatelný. Celkově je tedy asymptotické řešení pro $0 < \varepsilon \ll 1$ a pro všechna $\tau \geq 0$ nelineární kinetiky reprezentované systémem (2.16) následující:

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

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

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

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

$$\begin{aligned} z(\tau) &= \lambda \int_0^\tau v(\tau') d\tau', \\ w(\tau) &= 1 - v(\tau). \end{aligned} \tag{2.36}$$

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 uveďme, že systém (2.16) lze zobecnit na následující rovnice:

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

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

$$\frac{du}{d\tau} = f(u, v), \quad g(u, v) = 0, \quad u(0) = 1. \tag{2.38}$$

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

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

což nám dává samostaný dynamický popis u -reakce

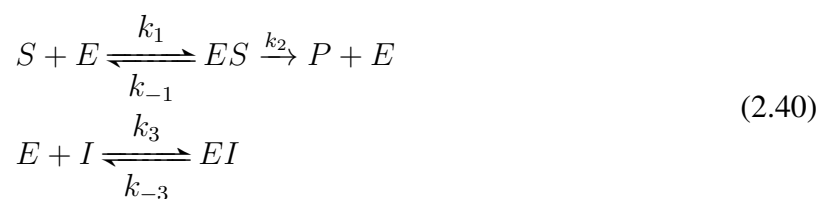
2.4 Inhibice a kooperace

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 (Šípal et al., 1992):

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

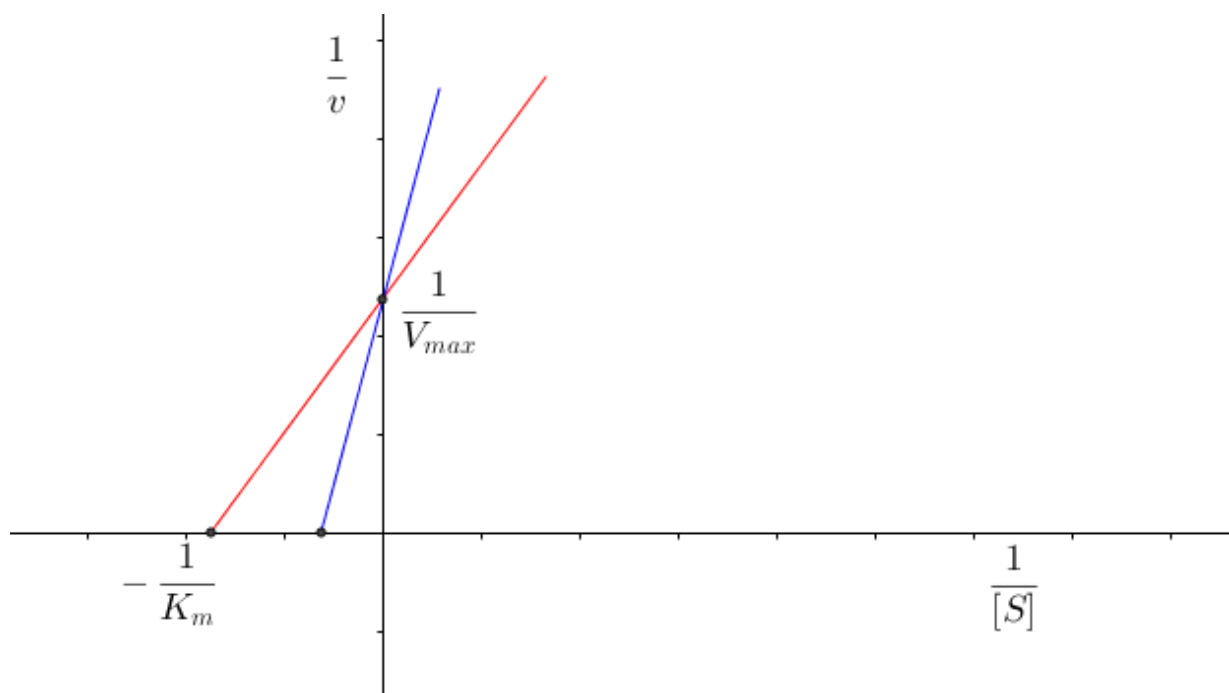
přičemž K_i je inhibiční konstanta definovaná jako disociační konstanta komplexu enzym-inhibitor:

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

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. 2.2).

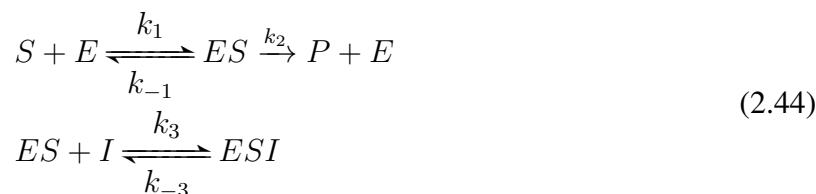
2.4.2 Akompetitivní inhibice

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 2.2: 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:

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

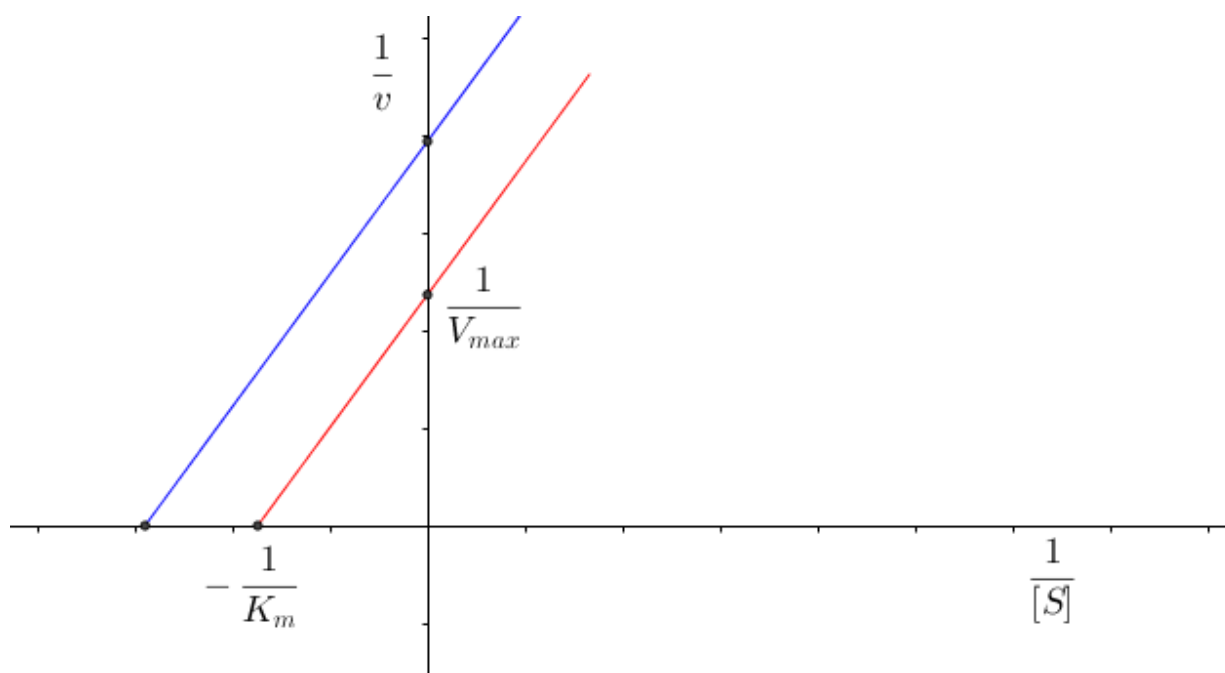
Možná reakce akompetitivního inhibitoru s komplexem enzym-substrát ovlivní rychlost reakce následujícím způsobem (Šípál et al., 1992):

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

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. 2.3).

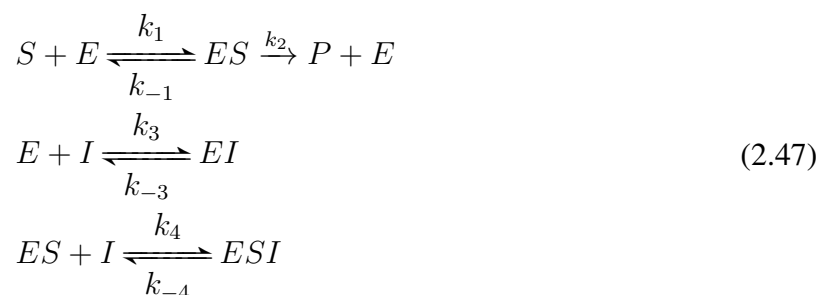
2.4.3 Nekompetitivní inhibice

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. En-



Obrázek 2.3: 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).

zym má dvě různá vazební 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:

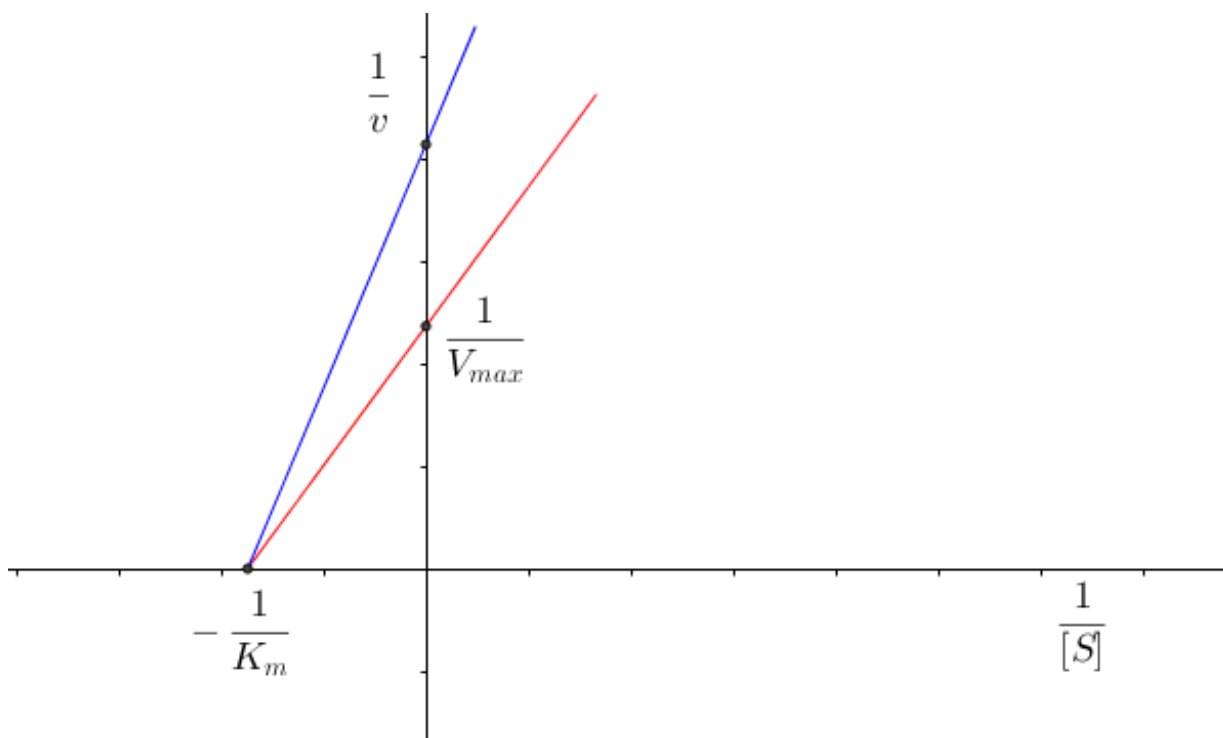


Soustava diferenciálních rovnic, z nichž každá popisuje změnu množství za jednotku času pro každou z reagujících látek při nekompetitivní inhibici, je následující:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[S]}{dt} &= -k_1[S][E] + k_{-1}[ES], \\
 \frac{d[E]}{dt} &= -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-3}[EI] - k_3[E][I], \\
 \frac{d[ES]}{dt} &= k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-4}[ESI] - k_4[EI], \\
 \frac{d[P]}{dt} &= k_2[ES], \\
 \frac{d[I]}{dt} &= k_{-3}[EI] - k_3[E][I] + k_{-4}[ESI] - k_4[EI], \\
 \frac{d[EI]}{dt} &= k_3[E][I] - k_{-3}[EI], \\
 \frac{d[ESI]}{dt} &= k_4[ES][I] - k_{-4}[ESI].
 \end{aligned}
 \tag{2.48}$$

Soustavu upravíme podle algoritmu, který jsme použili v předchozí části pro odvození rychlosti základní enzymatické reakce. Získáme vzorec pro rychlost reakce, která je nekompetitivně inhibována (Šípal et al., 1992):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{i(EI)}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{i(ESI)}} \right),
 \tag{2.49}$$



Obrázek 2.4: Kinetika enzymatické reakce v grafickém znázornění dle Lineweavera a Burka bez inhibitoru $i = 0$ (červená) a s nekompetitivním inhibitorem $i > 0$ (modrá).

kde pro jednotlivé inhibiční konstanty platí:

$$K_{i(ET)} = \frac{[E][I]}{[EI]}, \quad K_{i(ESI)} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}. \quad (2.50)$$

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. 2.4).

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:

$$Y = \frac{[E_2S] + 2[SE_2S]}{2[E_{2,tot}]} = \frac{[E_2S] + 2[SE_2S]}{2[E_2] + 2[E_2S] + 2[SE_2S]}. \quad (2.52)$$

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 (2.51) můžeme zjednodušit na tvar:



definujeme-li vazebnou konstantu jako:

$$K = \frac{[SE_2S]}{[E_2][S]^2} \quad (2.54)$$

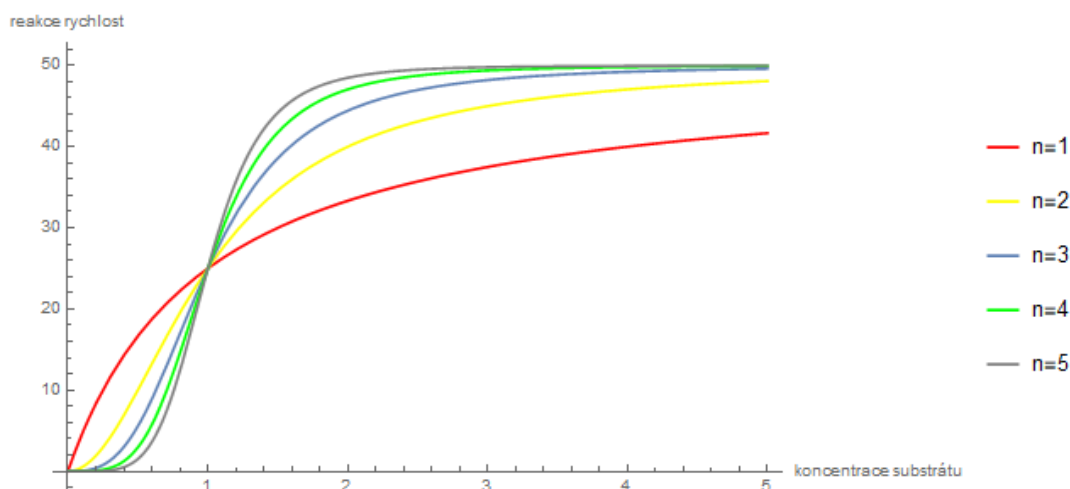
můžeme pro dílčí nasycení enzymu psát:

$$Y = \frac{2[SE_2S]}{2[E_{2,tot}]} = \frac{[SE_2S]}{[E_2] + [SE_2S]} = \frac{K[S]^2}{1 + K[S]^2}. \quad (2.55)$$

Rychlost takové reakce je pak dána (Murray, 2003):

$$v = V_{max}Y = \frac{V_{max}K[S]^2}{1 + K[S]^2}, \quad (2.56)$$

což je sigmoidální funkce v proměnné $[S]$.



Obrázek 2.5: 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 $K = 1$.

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

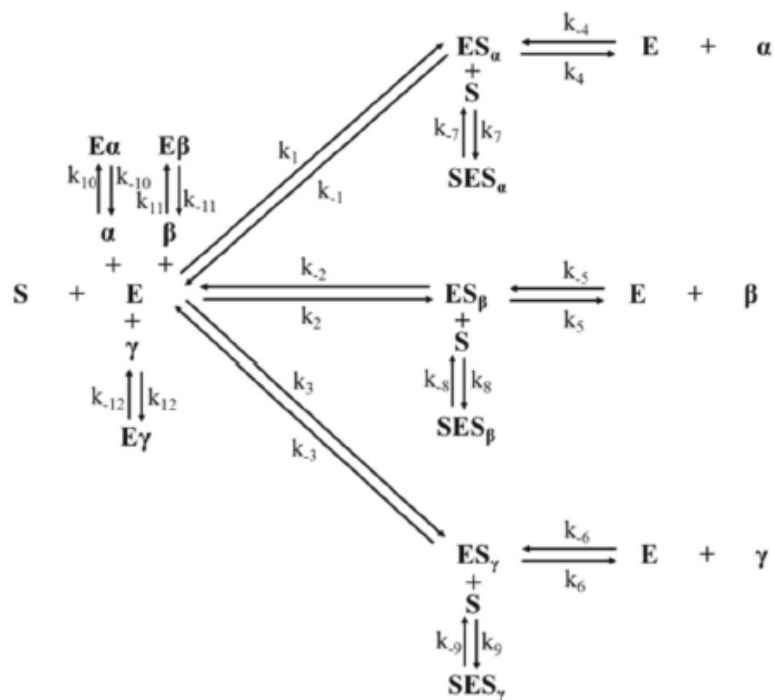
$$v = \frac{V_{max}K[S]^n}{1 + K[S]^n}, \quad (2.57)$$

což je obecný tvar tzv. Hillovy rovnice, která popisuje plnou kooperaci. Položením dílčího nasycení 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. 2.4.4).

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 dva výzkumy z posledních let.

Prvním aktuálním výzkumem, na který se podíváme, se zabývá studií matematických modelů a kinetiky produkce cyklodextrinu katalyzované enzymem Toruzymem a glukonotransferázou z kmene *Bacillus firmus*. My si představíme pouze nástin daného výzkumu, více se čtenář dozví



Obrázek 2.6: 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 (Pinheiro et al., 2017).

ve studii (Pinheiro et al., 2017).

Autoři této studie vyvinuli nový matematický model popisující kinetiku produkce α -, β - a γ -cyklodextrinu. Kinetické chování enzymu Toruzyme bylo studováno v reakci s maltodextrinem jako substrátem v různých koncentracích a s glukanotransferázou z kmene *Bacillus firmus* v koncentraci 100 gl^{-1} . Vytvořený matematický model dobře popisuje experimentálně získaná data, čímž se potvrdily hypotézy o kinetickém chování enzymu ve sledované reakci.

Schéma sledované kinetiky je uvedeno na obrázku 2.5. 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:

$$V_{\alpha} = k_4[ES_{\alpha}] - k_{-4}[E][\alpha] - k_{10}[E][\alpha] + k_{-10}[E\alpha], \quad (2.58)$$

kde $[ES_{\alpha}]$ značí koncentraci daného komplexu, $[E]$ představuje koncentraci enzymu, $[\alpha]$ 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 (Pinheiro et al., 2017)).

Následně autoři prokládali experimentálně získaná data řešeními popsaného modelu a odhadovali tak modelové parametry příklady dat a výsledků jejich prokládání řešeními modelu ukazuje obrázek 2.5.

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 (Pinheiro et al., 2017), kde se námi odvozený vztah pro rychlost enzymatické reakce zkomplikoval o členy vztahující se k jednotlivým typům cyklodextrinu.

Dále se podíváme na výzkum popsaný v článku (Shadbahr et al., 2017). 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

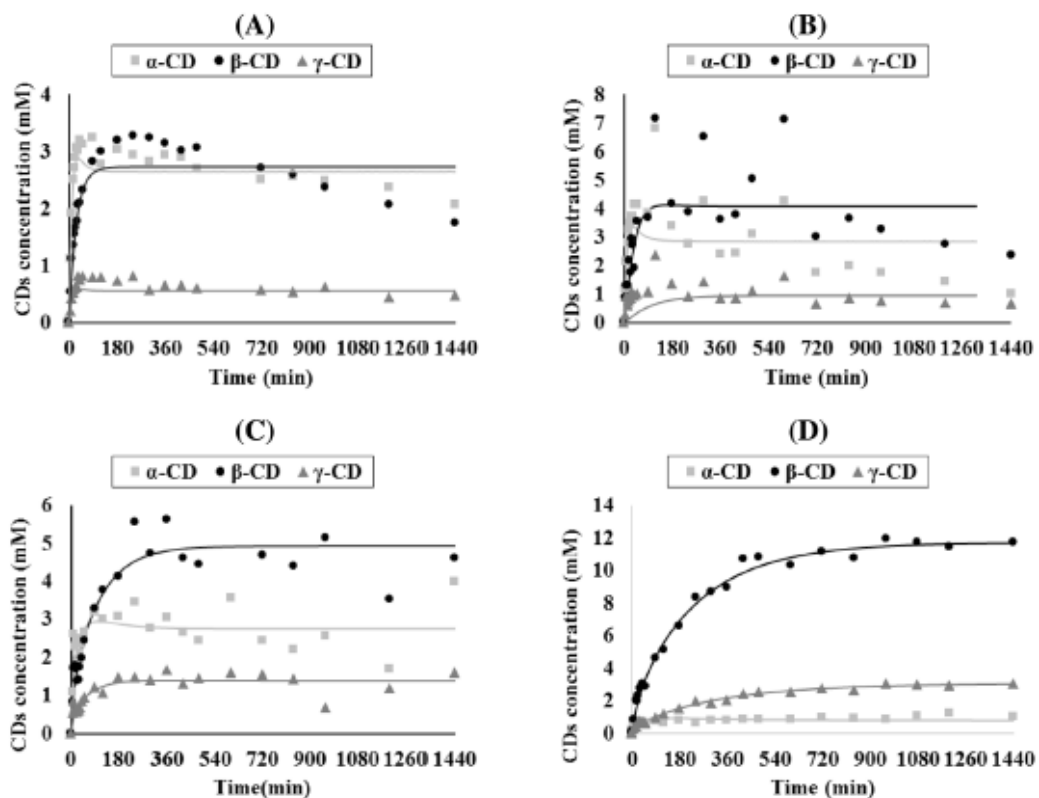
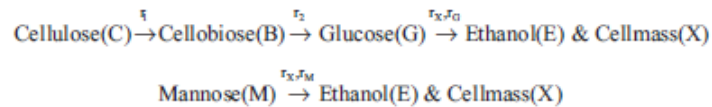


Fig. 3 Modelling of α -, β - and γ -CD production for 24 h of each enzyme under the process conditions. a Toruzyme[®] = 0.1% (v/v), CM = 20 g L⁻¹. b Toruzyme[®] = 0.1% (v/v), CM = 30 g L⁻¹.

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 2.7: Ukázka dat a jejich prokládání řešením kinetického modelu navrženého pro současnou produkci α -, β -, γ -cyklodextrinu. Převzato z práce (Pinheiro et al., 2017).



Obrázek 2.8: Reakční schéma přeměny na cukr a následného zkvašení. Převzato z práce (Shadbahr et al., 2017).

krokem je vznik etanolu a jeho dehydratace. Podrobnější popis přeměny, stejně jako podmínky, za kterých probíhá, si může čtenář přečíst v dané studii.

Autoři odvodili kinetický model popisující chemické reakce, jejichž schéma je načrtnuto na obrázku 2.5. Popisují rychlosti jednotlivých přeměn, jako příklad si uvedeme rovnici pro rychlost přeměny celulózy na celobiózu:

$$r_1 = \frac{k'_1[C]e^{-\lambda t}}{1 + [B]/K_{1B} + [G]/K_{1G}} \left(\frac{K_{1E}}{K_{1E} + [E]} \right), \quad (2.59)$$

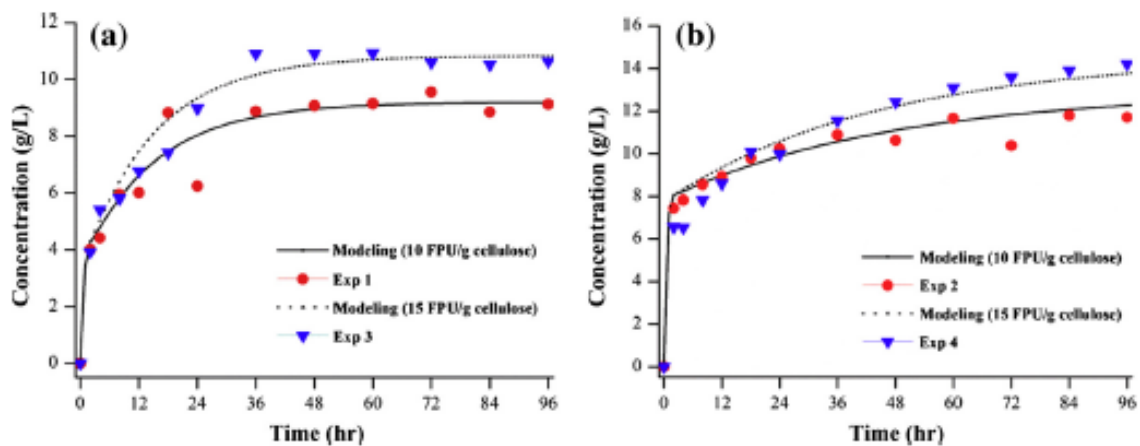
kde $[X]$ značí koncentraci látky X , K_{1B} je inhibiční konstanta celulózy celobiózou, obdobně K_{1E} je inhibiční konstanta celulózy etanolem, K_{1G} představuje inhibiční konstantu celulózy glukózou. Specifickou rychlost hydrolýzy celulózy na celobiózu k'_1 definují autoři jako:

$$k'_1 = \frac{k_1[ENZY M]}{K_{eq} + [ENZY M]}, \quad (2.60)$$

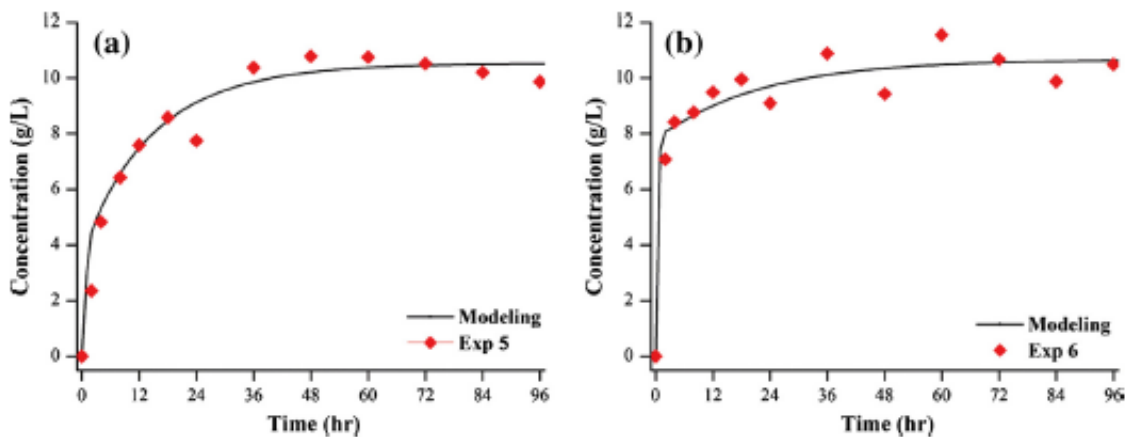
kde je K_{eq} celúzová adsorpční saturační konstanta. Na základě těchto rovnic vytvořili autoři soustavu diferenciálních rovnic popisující změnu koncentrace jednotlivých látek, které se reakcí účastní.

Po sestavení modelu opět následovalo prokládání dat jeho řešením, které je téměř nedílnou součástí každé tvorby nového matematického modelu (obr. 2.5). Autoři získali sadu parametrů, které mohou popisovat jiné probíhající procesy (obr. 2.5) 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 až při vysokém enzymovém zatížení a nízkých



Obrázek 2.9: 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 (Shadbahr et al., 2017).



Obrázek 2.10: Srovnání predikce modelu a experimentální koncentrace etanolu při zatížení enzymů 20 FPU/g celulózy. Převzato z práce práce (Shadbahr et al., 2017).

počátečních koncentracích cukrů. Dále studie ukázala, že počáteční koncentrace cukru výrazně ovlivňuje rychlost reakce a hodnoty rychlostních konstant. Největší výtěžnost etanolu byla při 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).

Kapitola 3

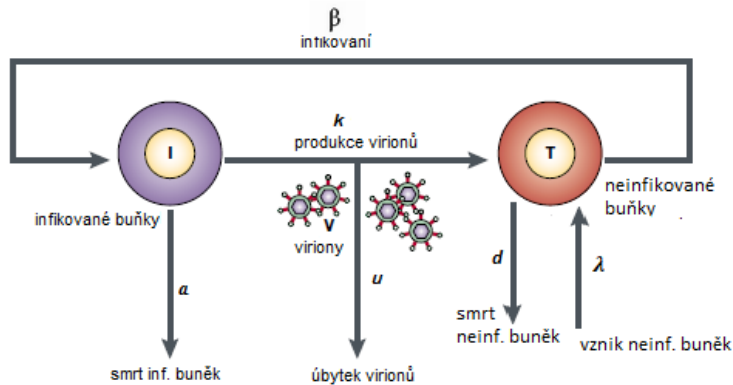
Modelování virových infekcí

Další kapitolou práce je kapitola věnovaná matematickým modelům, které popisují virovou infekci z hlediska dějů probíhajících na buněčné úrovni. V práci se zabýváme popisem infekce HIV a chřipky. Pro každou z těchto infekcí si uvedeme základní model, ze kterého vycházejí různá rozšíření. Na některá rozšíření se podíváme podrobněji, jiné si pouze zmíníme. V části kapitoly věnované modelování HIV infekce bylo čerpáno z (Nowak and Bangham, 1996; Perelson, 2002). Pro část práce věnovanou modelování infekce chřipky bylo čerpáno z práce (Baccam et al., 2006). Nakonec představíme některé aktuální výzkumy v oblasti modelování virových infekcí.

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.

V základním modelu uvažujeme 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



Obrázek 3.1: Základní model virové infekce HIV. Upraveno podle (Perelson, 2002).

V . Většina buněk má schopnost buněčného dělení, takže neinfikované buňky neustále vznikají, 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 zakreslit do obrázku (obr. 3.1) nebo zapsat pomocí soustavy tří diferenciálních rovnic jako rychlost změny množství jednotlivých složek systému:

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

Podívejme se na analýzu systému (3.1). Z rovnic plyne, že průměrná délka života infikované buňky je $\frac{1}{a}$ a průměrná délka života volného virionu je $\frac{1}{u}$. Celkový počet virionů, které vyprodukuje jedna infikovaná buňka je roven $\frac{k}{a}$. Pro to, zda se bude infekce šířit, je rozhodující reprodukční poměr virů, tedy číslo:

$$R_0 = \frac{\beta \lambda k}{a d u}. \quad (3.2)$$

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 pro rovnovážný stav systému platí:

$$T_0 = \frac{\lambda}{d}, I_0 = 0, V_0 = 0. \quad (3.3)$$

Pokud bude naopak platit $R_0 > 1$, pak každá infikovaná buňka vytváří průměrně více jak jednu nově infikovanou buňku (přesně R_0 takových buněk). Infekce se tedy šíří dále po organismu, 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, ve kterém platí:

$$\begin{aligned} T^* &= \frac{au}{k\beta}, \\ I^* &= \frac{\lambda}{a} - \frac{du}{k\beta}, \\ V^* &= \frac{\lambda k}{au} - \frac{d}{\beta}. \end{aligned} \quad (3.4)$$

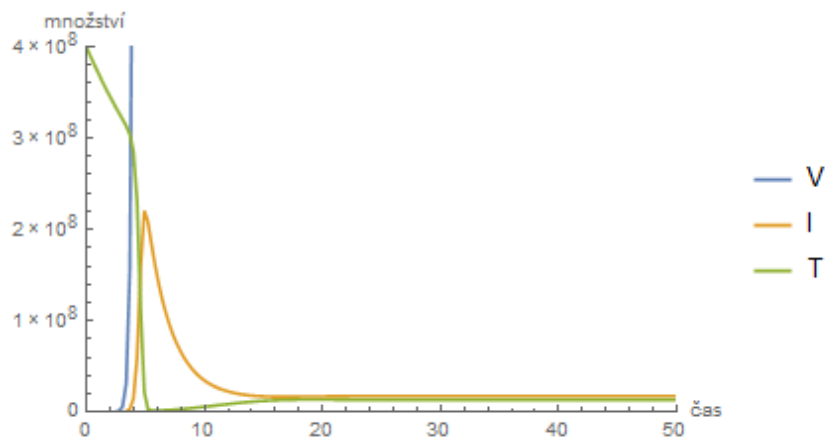
Jak je již zmíněno výše, šíření viru je limitováno množstvím neinfikovaných buněk a v rovnovážném stavu (3.4) každá infikovaná buňka produkuje v průměru jednu nově infikovanou buňku. Tím pádem pro dosažení množství viru, které odpovídá stabilnímu ekvilibriu, není nezbytné vyvolat imunitní odpověď organismu, ale nastává stav dlouhodobé či trvalé infekce.

Než se podíváme na nějaká rozšíření tohoto modelu, ukážeme si graf jeho numerického řešení (obr. 3.2). Vidíme, že poté, co se v organismu začnou vyskytovat viriony, množství neinfikovaných buněk výrazně klesá a naopak roste množství těch infikovaných. Po určitém čase se množství buněk, infikovaných i neinfikovaných, ustálí, systém se dostává 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 popsaný soustavou (3.1) dopl-



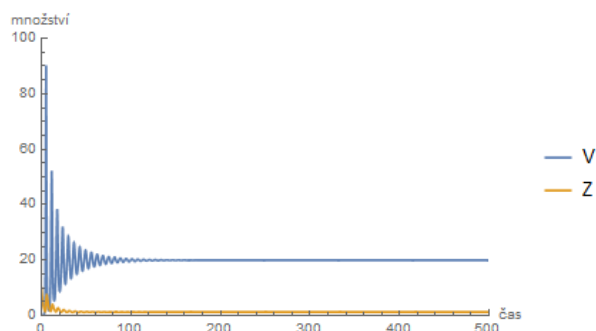
Obrázek 3.2: Numericky spočtené průběhy množství neinfikovaných buněk T , infikovaných buněk I a virionů V podle soustavy (3.1) pro parametry uvedené v tabulce 3.1.

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

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

kde c značí rychlost množení lymfocytů a b znázorňuje, jak rychle se lymfocyty rozkládají při nedostatku infikovaných buněk. Rychlost, s jakou T-lymfocyty zabíjejí infikované buňky, je dána parametrem p .

Předpokládejme, že je v organismu přítomno minimální množství infikovaných buněk, které je schopno vyvolat buněčnou imunitní odpověď. Pokud $cI > b$, pak se buněčná imunitní odpověď, čili množství cytotoxických T-lymfocytů, bude zvyšovat. Pokud bude platit $cI^* < b$, kde I^* je definováno v (3.4), cytotoxické T-lymfocyty budou aktivované pouze po přechodnou dobu a systém konverguje k ekvilibriu dané vztahy (3.4). Pro případ, kdy platí $cI^* > b$, systém vykazuje



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.

tlumené oscilace k ekvilibriu danému rovnicemi:

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

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.

Pokud by čtenáře zajímaly různé odlišnosti v buněčné imunitní odpovědi či další rozšíření tohoto modelu, může nahlédnout do studie (Nowak and Bangham, 1996).

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 ekvilbria. To můžeme vidět i v případě křivky znázorňující změny v populaci T-lymfocytů.

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 projeví přítomnost léčiv. Pro popis účinku antiretrovirových léčiv je třeba základní model (3.1) upravit. 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 uvažujeme přítomnost léčiv, získáme následující model:

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

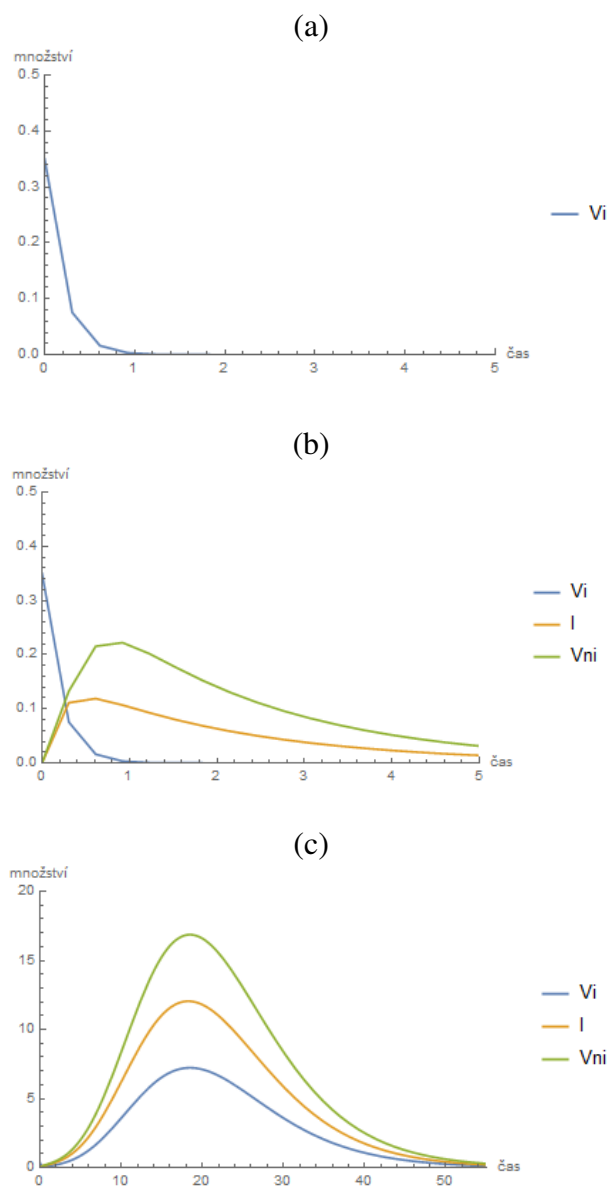
Členy ϵ_{RT} a ϵ_{PI} udávají účinnosti reverzní transkriptázy a inhibitorů proteázy. Čím vyšší hodnotu má ϵ , tím jsou léky účinnější (pokud je $\epsilon = 1$, účinnost je stoprocentní a v organismu se nenachází žádná infekce). V_I značí počet virionů, které jsou schopné buňku infikovat a V_{NI} počet virionů, které tuto schopnost nemají.

Pokud by účinek inhibitorů proteázy byl stoprocentní ($\epsilon_{PI} = 1$) a počet neinfikovaných buněk T by zůstal neměnný, pro množství viru V v organismu by platilo:

$$V(t) = V_I(t) + V_{NI}(t) = V_0 \exp(-ut) + \frac{uV_0}{u-a} \left[\frac{uV_0}{u-a} \{ \exp(-at) - \exp(-ut) \} - at \exp(-ut) \right] \tag{3.8}$$

Podrobnější analýzu tohoto systému v práci uvádět nebudeme. Je samozřejmé, že léky ovlivní jednotlivé hodnoty v ekvilibriu. Množství infikovaných buněk i virionů poklesne oproti (3.4) 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. 3.4(a)), v řešení se nám vyskytuje pouze malé množství virionů, které jsou schopny infikovat buňku. Po krátké době se všechny viriony ztrácí a křivka se dostává na nulu. V případě



Obrázek 3.4: Numericky spočtené průběhy infikovaných buněk I , virionů schopných infikovat buňku 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 na obrázcích b, c je vynásobeno 50.

zobrazeném na obrázku 3.4(b) 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 3.4(c) 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 roste velikost populací obou uvažovaných skupin virionů. Více je těch, které nemohou buňku infikovat. Obě tyto populace po čase vymírají. Dále si můžeme všimnout výskytu malého množství infikovaných buněk. Je také třeba upozornit, že ne všechny obrázky mají stejné škálování os.

Podívejme se nyní na vzájemné porovnání obrázků. Začneme s obrázky 3.4(a,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 3.4(b,c), které se liší účinkem inhibitoru proteázy, je velký rozdíl. Vidíme, že v případě sedmdesátiprocentní účinnosti reverzní transkriptázy a inhibitorů proteázy (obr. 3.4(c)), obě populace virionů rostou a přežívají daleko déle než v případě obrázku 3.4(b), 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 spousta, my jsme se rozhodli uvést rozšíření zahrnující buněčnou imunitní odpověď a přítomnost léčiv. Pokud by se čtenář chtěl o této oblasti dozvědět více, může k tomu použít například práce (Nowak and Bangham, 1996; Perelson, 2002; Bonhoeffer et al., 1997; Perelson et al., 1996).

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.

parametr	význam	hodnota	jednotky
λ	rychlost vzniku neinfikovaných buněk	10^7	den^{-1}
d	rychlost zániku neinfikovaných buněk	0.1	den^{-1}
β	rychlost infekce	$3.75 \cdot 10^{-10}$	$(\text{TCID}_{50}/\text{ml})^{-1} \text{den}^{-1}$
a	rychlost zániku infikovaných buněk	0.5	den^{-1}
k	rychlost vzniku virionů	500	$[(\text{TCID}_{50}/\text{ml})^{-1} \text{den}^{-1}]$
u	rychlost zániku virionů	20	den^{-1}
p	rychlost zániku infikovaných buněk působením T-lymfocytů	2.5	den^{-1}
c	rychlost vzniku T-lymfocytů	2.5	den^{-1}
b	rychlost zániku T-lymfocytů	0.5	den^{-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 (Bonhoeffer et al., 1997; Nowak and Bangham, 1996).

3.2 Chřipka

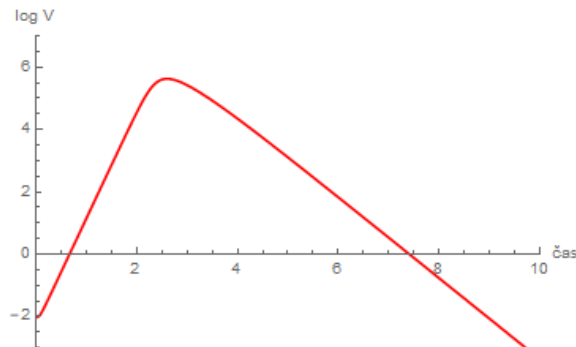
Během tří velkých pandemií chřipky ve 20. století podlely chřipce miliony lidí. Stejně jako HIV infekce i chřipka tedy představuje světový problém, kterému je třeba věnovat pozornost. Základní principy virové kontroly během nekomplikované infekce virem chřipky nejsou stále plně pochopeny. Nicméně základní 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 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.

Model tedy vypadá následovně:

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

Jediným měřitelným ukazatelem přítomnosti infekce v organismu je množství virionů, standardně se tedy řešení takovýchto systémů vykresluje právě jako časový průběh změn v jejich populaci (obr. 3.5). Stejně jako v případě HIV infekce, definujeme základní reprodukční poměr virů R_0 . Toto číslo představuje průměrný počet infikovaných buněk, kdy jejich infekce je způsobena jednou buňkou. Jinými slovy, kolik neinfikovaných buněk dokáže jedna infikovaná buňka infikovat. Pokud je tedy toto číslo větší než jedna, $R_0 > 1$, pak se infekce šíří organismem. A naopak infekce mizí pokud platí $R_0 < 1$. Pro náš model (3.9) je základní reprodukční poměr virů definován



Obrázek 3.5: Časový průběh změn v množství virionů během infekce popsané modelem (3.9) pro parametry uvedené v tabulce 3.2.

takto:

$$R_0 = \frac{k\beta T_0}{au}. \quad (3.10)$$

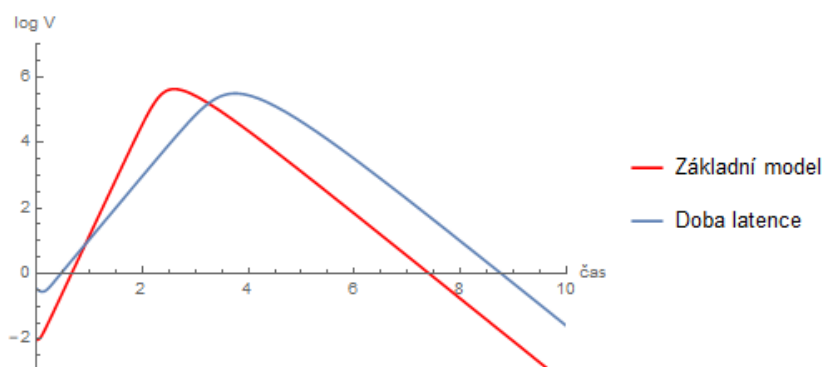
Toto by bylo stručné představení základního modelu pro infekci chřipky. Teď se podíváme na rozšíření, které uvažuje určitou prodlevu při produkci virionů infikovanými buňkami.

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:

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



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.

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 dvadny 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

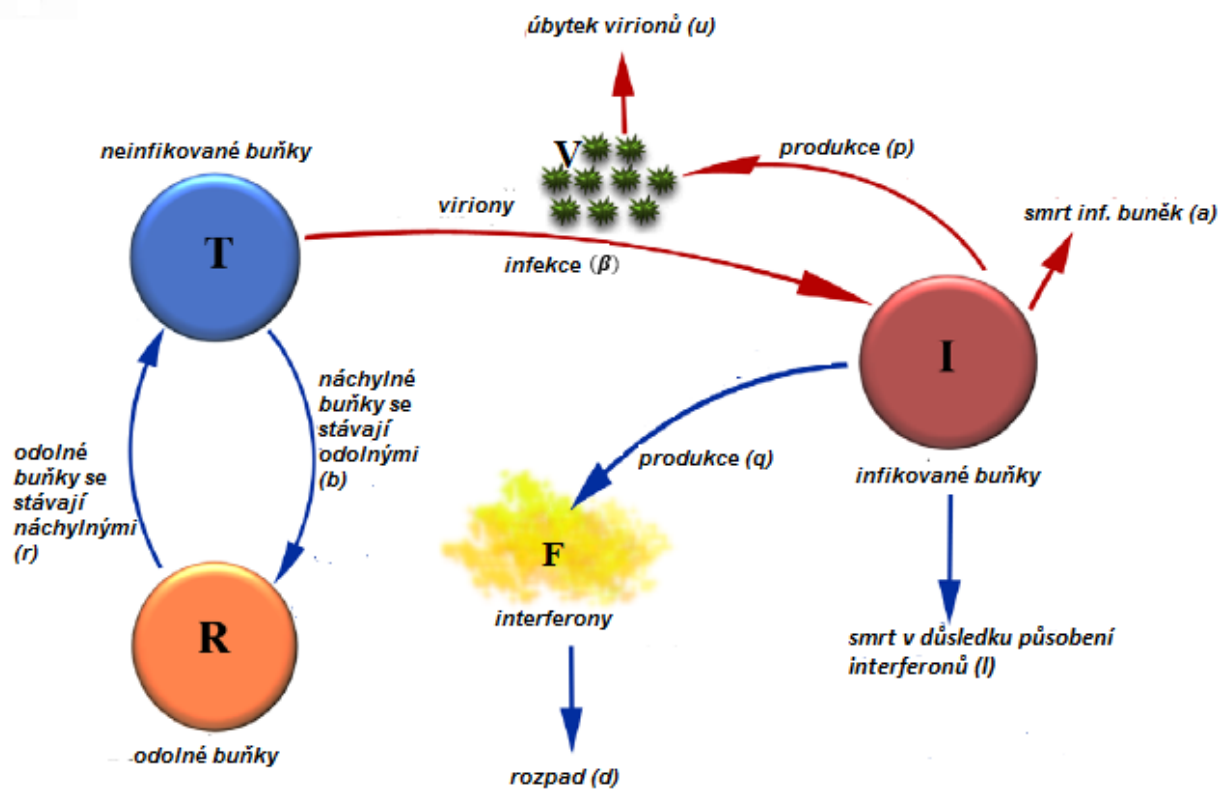
Jako další příklad, jak základní model (3.9) rozšířit, si uvedeme model, kde budeme uvažovat přítomnost interferonů a jejich působení na buňky. Interferony jsou proteiny nespecifické imunity, které se podílejí na protivirové obraně organismu. K modelu přibudou dvě rovnice, jedna popisující změnu množství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

infekci, které vzniknou působením interferonů na neinfikované buňky T . Získáme tedy model:

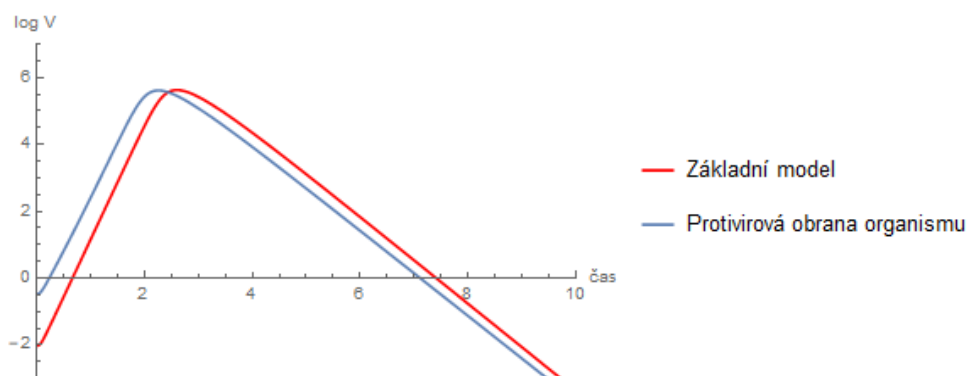
$$\begin{aligned}
 \frac{dT}{dt} &= -\beta VT - bFT + rR, \\
 \frac{dI}{dt} &= \beta VT - aI - lIF, \\
 \frac{dR}{dt} &= bFT - rR, \\
 \frac{dV}{dt} &= kI - uV, \\
 \frac{dF}{dt} &= qI - dF.
 \end{aligned}
 \tag{3.12}$$

První z rovnic popisuje změny v populaci neinfikovaných buněk T , parametr β popisuje, jak rychle se buňky infikují. S rychlostí b se neinfikované buňky stanou odolné vůči infekci a naopak parametr r vyjadřuje změnu, kdy 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 u předchozího rozšíření si porovnáme časové změny v množství virionů během nákazy (obr.3.2.1). Z obrázku vidíme, že pokud dochází k protivirové braně 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 (Pawelek et al., 2012). Další možnosti rozšíření může čtenář nalézt například v pracích (Saenz et al., 2010; Baccam et al., 2006; Boianelli et al., 2015).



Obrázek 3.7: Rozšíření základního modelu infekce chřiky o přítomnost a působení interferonů. Upraveno podle (Pawelek et al., 2012).



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.

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

Tabulka 3.2: Přehled parametrů potřebných v uvedených modelech pro infekci chřipky, data čerpána z prací (Pawelek et al., 2012; Baccam et al., 2006).

3.3 Aktuální výzkum v modelování virových infekcí

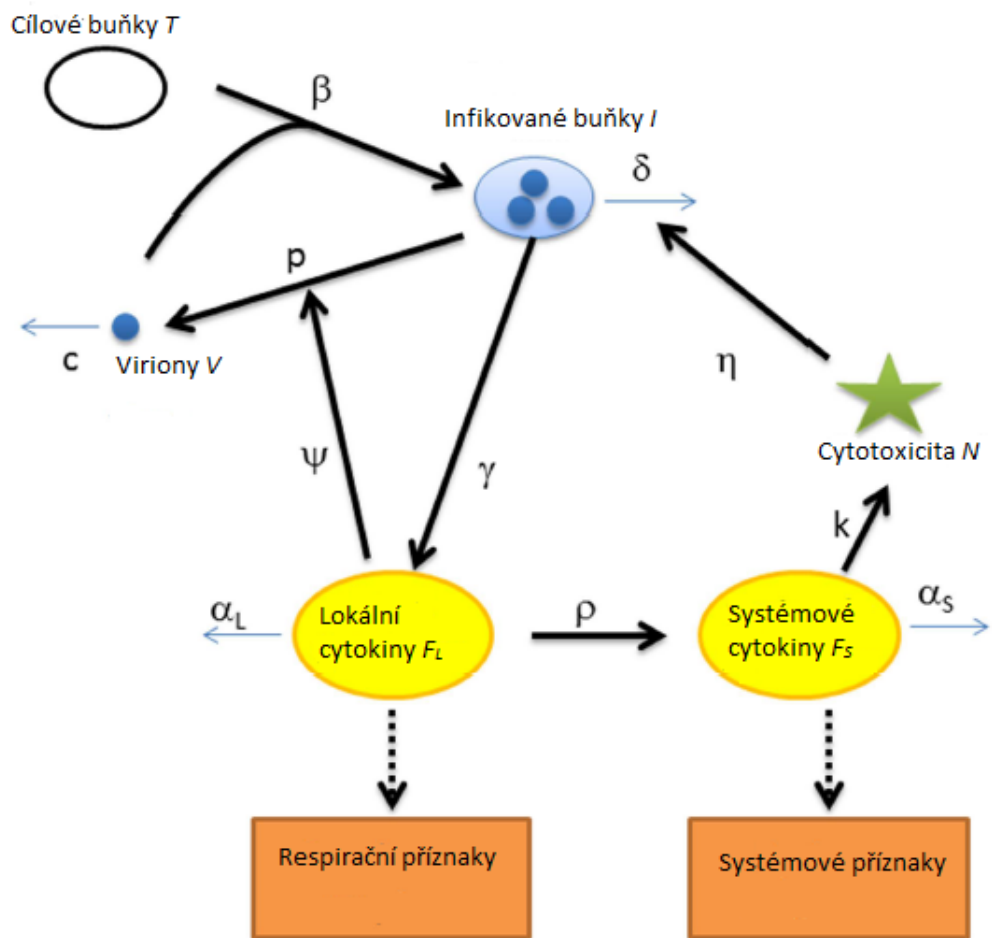
Jak jsme se již zmiňovali dříve, onemocnění chřipkou představuje aktuální světový problém. Stále tedy vědci pracují na zdokonalení základního modelu (3.9). Podívejme se na nyní na studii zabývající se heterogenním šířením chřipky mezi lidmi a důsledky pro epidemiologii a její kontrolu (Canini et al., 2016).

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 heterogenitou přenosu 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 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 .

Pro nalezení realistické parametrizace modelu provedli autoři prokládání dat řešením modelu



Obrázek 3.9: Schéma dynamického modelu chřipkové infekce uvnitř hostitele. Upraveno dle práce (Canini et al., 2016).

(3.13), o kterém si čtenář může přečíst v dané práci, my jej zde uvádět nebudeme. 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 postkoinfekce chřipkovými viry typu A spolu s bakterií *Streptococcus pneumoniae* (Cheng et al., 2017). 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 důsledku chřipky komplikované bakteriálním zápal 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*. Poďvejme se na soustavu, kterou autoři přinášejí:

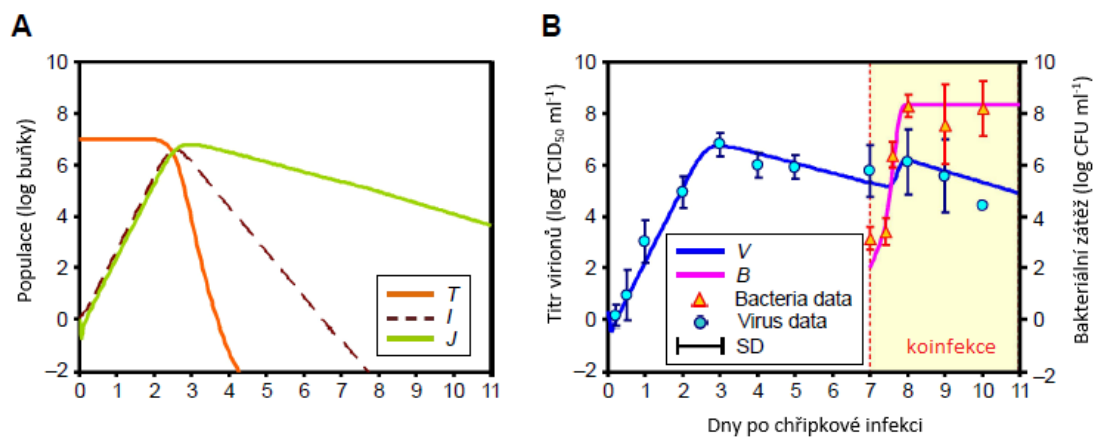
$$\begin{aligned}
\frac{dT}{dt} &= -\beta TV, \\
\frac{dI}{dt} &= \beta TV - kJ - \mu IB, \\
\frac{dJ}{dt} &= kI - \delta J - \mu JB, \\
\frac{dV}{dt} &= pJ(1 + aB^z) - cV, \\
\frac{dB}{dt} &= rB \left(1 - \frac{B}{K_B(1 + \psi V)}\right) - \gamma M_A F M_A^* B \left(1 - \frac{\phi V}{K_{BV} + V}\right),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

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 (smrt v důsledku působení bakterií). 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. Poslední rovnice definuje funkci fagocytózy F , 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).

Výsledky studie ukázaly, že infikované buňky neprodukující viriony a infikované buňky produkující viriony významně vzrostly a vyvrcholily 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 epiteliální 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). Také autoři 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 dalšího 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.



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 (Cheng et al., 2017).

Kapitola 4

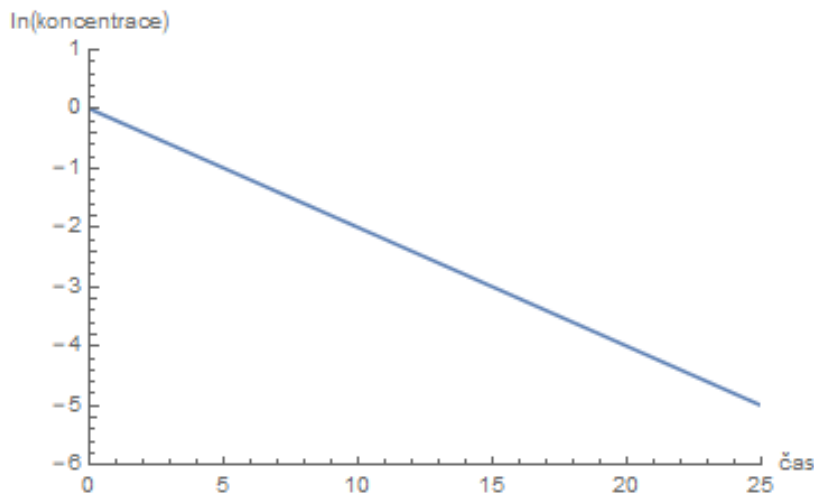
Matematické modely ve farmakologii

V této kapitole se podíváme na 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 se proto podíváme na farmakokinetiku, následně na farmakodynamiku a pak si popíšeme základní model, který obě oblasti propojuje. Pokud by se chtěl čtenář o dané problematice dozvědět více, může ke studiu použít např. práce (Macheras and Iliadis, 2006; Nielsen and Frieberg, 2013), z kterých vychází i tato kapitola. V závěru kapitoly se 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.



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

Druhý výzkum je věnován působení erenumabu na 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, dvousložkové nebo vícesložkové, těm posledním se v práci věnovat nebudeme.

V případě jednosložkového modelu zapisujeme 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 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 odrážel 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 tedy tento čas pro reakci prvního stupně (jednosložkový model), vyjdeme z diferenciální rovnice (4.1), kterou budeme řešit pomocí metody separací proměnných. Postup je následující:

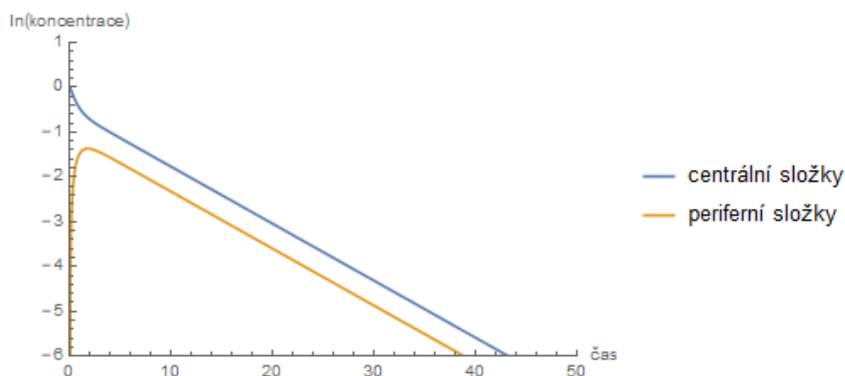
$$\begin{aligned} -\frac{1}{[C_p]} \frac{d[C_p]}{dt} &= k_e \\ -\ln[C_p](t) + \ln[C_p](0) &= k_e t \\ \ln \frac{[C_p](t)}{[C_p](0)} &= -k_e t \\ \frac{[C_p](t)}{[C_p](0)} &= e^{-k_e t} \\ [C_p](t) &= [C_p](0)e^{-k_e t} \\ \frac{[C_p](0)}{2} &= [C_p](0)e^{-k_e t_{1/2}} \end{aligned}$$

Pro poločas reakce pak 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:

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



Obrázek 4.2: Grafické řešení modelu (4.5) pro rychlostní konstantu $\frac{CL}{V_o} = 0.2$, $\frac{Q}{V_p} = 0.5$ a $\frac{Q}{V_o} = 1$. 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.

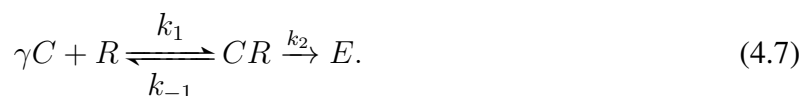
kde $[C_p]$ a $[C_o]$ představuje koncentraci léku v plazmě a orgánech a V_p , V_o jsou odpovídající distribuční objemy těchto složek. Q je mezisložkové odbourávání léku. Grafické řešení této soustavy ukazuje obrázek 4.2.

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

$$P = \int_0^{\infty} [C_p](t)dt. \quad (4.6)$$

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 . Ačkoli se γ definuje jako počet molekul potřebných k aktivaci jednoho receptoru, jedná se pouze o teoretické číslo, které usnadňuje práci s daty. Poměr rychlostních konstant k_{-1}, k_1 představuje disociační konstantu k_D komplexu lék-receptor. Rychlostní konstantu k_2 můžeme dát do vztahu s koncentrací komplexu lék-receptor $[CR](t)$ a farmakologickým účinkem $E(t)$, zmíněný vztah je následující:

$$E(t) = k_2[CR](t). \quad (4.8)$$

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

$$E_{max} = k_2R_0. \quad (4.9)$$

Při koncentraci léku $[C](t)$ a celkovém počtu receptorů R_0 pak máme:

$$\frac{d[CR]}{dt} = k_1[C]^\gamma(t)[R_0 - [CR](t)] - k_{-1}[CR](t) \quad (4.10)$$

s počáteční podmínkou

$$[CR](0) = 0. \quad (4.11)$$

V ekvilibriu pak platí:

$$[CR]^* = \frac{R_0[C]^{*\gamma}}{k_D + [C]^{*\gamma}}, \quad (4.12)$$

kde $[CR]^*$ a $[C]^*$ jsou koncentrace komplexu lék-receptor a léku, kterých dosahují v ekvilibriu. Kombinací této rovnice spolu s rovnicemi (4.8) a (4.9) získáme rovnici pro tzv. sigmoidální E_{max} model:

$$E^* = \frac{E_{max}[C]^{*\gamma}}{k_D + [C]^{*\gamma}}. \quad (4.13)$$

V případě, že je γ rovno jedné, se model (4.13) nazývá základní E_{max} model, který ale umožňuje v porovnání se sigmoidálním E_{max} modelem méně flexibility.

Za předpokladu rychlého ustavení rovnováhy lék-receptor, tedy $[C]^* \approx [C](t)$, můžeme rovnici (4.13) přepsat do tvaru:

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

z kterého vidíme, že farmakologický účinek je závislý na čase.

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

$$E = \frac{E_{max}[C]^\gamma}{EC_{50}^\gamma + [C]^\gamma}, \quad (4.15)$$

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 určeno funkcí jeho hodnoty bez léku E_0 a koncentrací léku $[C]$:

$$E = E_0 \pm \frac{E_{max}[C]^\gamma}{EC_{50}^\gamma + [C]^\gamma}. \quad (4.16)$$

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

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. Popíšme 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_{growth} a jejich smrt s rychlostní konstantou k_{death} . Za předpokladu exponenciálního růstu má rovnice tvar:

$$\frac{dB}{dt} = k_{growth}B - k_{death}B \quad (4.17)$$

Pokud v organismu nejsou přítomné léky a $k_{growth} > k_{death}$, 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 (4.18) nebo zkracovat délku jejich života, což popisují rovnice (4.19) a (4.20):

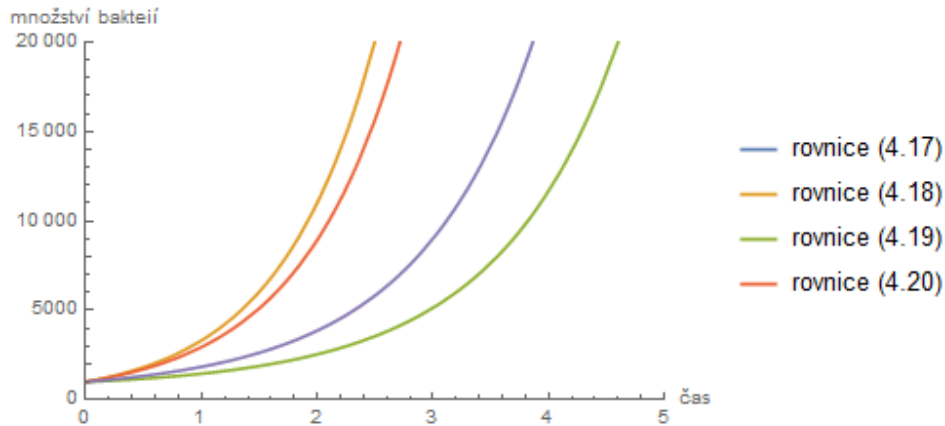
$$\frac{dB}{dt} = k_{growth} \left(1 - \frac{E_{max}[C_p]^\gamma}{EC_{50}^\gamma + [C_p]^\gamma} \right) B - k_{death} B \quad (4.18)$$

$$\frac{dB}{dt} = k_{growth} B - k_{death} \left(1 + \frac{E_{max}[C_p]^\gamma}{EC_{50}^\gamma + [C_p]^\gamma} \right) B \quad (4.19)$$

$$\frac{dB}{dt} = k_{growth} B - k_{death} B - \left(\frac{E_{max}[C_p]^\gamma}{EC_{50}^\gamma + [C_p]^\gamma} \right) B \quad (4.20)$$

V rovnici (4.19) je účinnost popisována jako proporcionální nárůst mortality bakterií. Naopak v rovnici (4.20) 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 komplikovanější.

Na obrázku 4.3 vidíme grafické řešení těchto tří rovnic a rovnice (4.17), která popisuje situaci bez léku. Všimněme si, že nejpomaleji roste zelená křivka znázorňující řešení rovnice, kdy lék úměrně urychluje umírání bakterií. Naopak nejrychleji roste křivka představující řešení rovnice, kdy lék inhibuje růst bakterií (žlutá křivka).



Obrázek 4.3: Grafické řešení rovnic (4.17), (4.18), (4.19) a (4.20) pro parametry $C_p(0) = 2$, $B(0) = 10^3$ CFU/ml, $\gamma = 1.5$, $E_{C_{50}} = 10$, $k_{growth} = 1.4 \text{ h}^{-1}$, $k_{death} = 0.2 \text{ h}^{-1}$, $E_{max} = 3 \text{ h}^{-1}$, $k_e = 0.2$. Parametry převzaty z práce (Nielsen and Frieberg, 2013).

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 (Nielsen and Frieberg, 2013).

Existující 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 odhaduje na základě hodnoty E_{max} nebo $E_{C_{50}}$ nebo obou hodnot. Podívejme se, jakým způsobem se model změní, pokud budeme uvažovat dvě subpopulace:

$$\begin{aligned} \frac{dB_1}{dt} &= k_{growth}B_1 - k_{death}B_1 - \frac{E_{max-B_1}[C_p]^\gamma}{c^\gamma + EC_{50-B_1}^\gamma}B_1, \\ \frac{dB_2}{dt} &= k_{growth}B_2 - k_{death}B_2 - \frac{E_{max-B_2}[C_p]^\gamma}{c^\gamma + EC_{50-B_2}^\gamma}B_2. \end{aligned} \quad (4.21)$$

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 působením léku zahrnuje tento model čacově závislý adaptační faktor α , pro něj platí:

$$\alpha = 1 + \beta (1 - \exp([C_p]t\tau)), \quad (4.22)$$

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

$$\frac{dB}{dt} = k_{growth}B - k_{death}B - \frac{E_{max}[C_p]^\gamma}{[C_p]^\gamma + \{[1 + \beta (1 - \exp([C_p]t\tau))]\} E_{C50}} B. \quad (4.23)$$

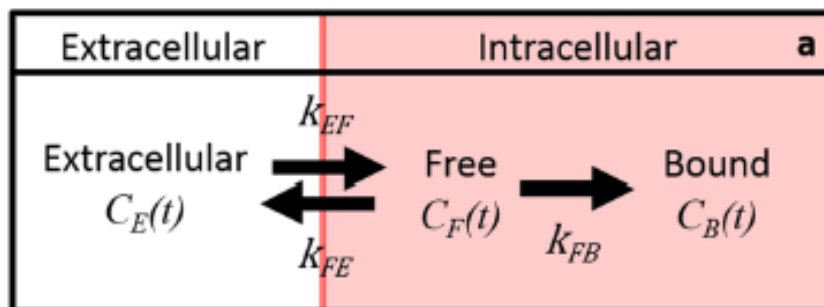
4.4 Aktuální výzkum v oblasti modelování ve farmakologii

Stejně jako u předchozích kapitol i zde si představíme dva výzkumy z posledních let. Nejprve se podíváme na studii, kde autoři na základě matematického modelu předpovídají dávku doxorubicinu u karcinomu prsu (McKenna et al., 2017).

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:

$$\begin{aligned} \frac{dC_E(t)}{dt} &= k_{FE} \frac{v_I}{v_E} C_F(t) - k_{EF} C_E(t), \\ \frac{dC_F(t)}{dt} &= k_{EF} \frac{v_E}{v_I} C_E(t) - k_{FE} C_F(t) - k_{FB} C_F(t), \\ \frac{dC_B(t)}{dt} &= k_{FB} C_F(t), \end{aligned} \quad (4.24)$$



Obrázek 4.4: Schéma třísložkové kinetiky doxorubicinu. Převzato ze studie (McKenna et al., 2017).

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 topoizomerázy 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:

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

$$k_d(t, D) = \begin{cases} 0 & \text{pro } t < 0 \\ k_{d,A}(D) & \text{pro } t \geq 0 \end{cases} \quad (4.25)$$

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

kde k_p a k_d jsou rychlosti proliferace a úmrtnosti buněk, r je konstanta popisující rychlost, při které léčba indukuje účinek, θ je nosná kapacita 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 (4.24).

Autoři zjistili, že pro popis absorpce doxorubicinu v různých typech buněk postačí model tříkompartimentový. Průměrné procentní chyby modelu ve všech ošetrovacích podmínkách byly u těchto typů buněk 31,8%, 34,6%, 23,5% a 26,8%. 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 (Vu et al., 2017). 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):

$$\frac{d[A_{SC}]}{dt} = -k_a[A_{SC}], \quad (4.26)$$

s počáteční podmínkou:

$$[A_{SC}](0) = \frac{1}{1 + \exp(F)} D_{SC}, \quad (4.27)$$

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) $[A_p]$:

$$\begin{aligned} \frac{d[A_p]}{dt} &= k_a[A_{SC}] + k_{op}[A_o] - k_{int}[A_p] - (k_{po} + k_{pe} - k_{int})[AMG334]_{unbound}V_p, \\ \frac{d[A_o]}{dt} &= k_{po}[AMG334]_{unbound}V_p - k_{pe}[A_o], \end{aligned} \quad (4.28)$$

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):

$$\Delta DBF_t = \Delta DBF_0 \left(1 - \frac{I_{max}[AMG334]^h}{IC_{50} + [AMG334]^h} \right), \quad (4.29)$$

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. Představme si alespoň některé výsledky 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

Vlastní model

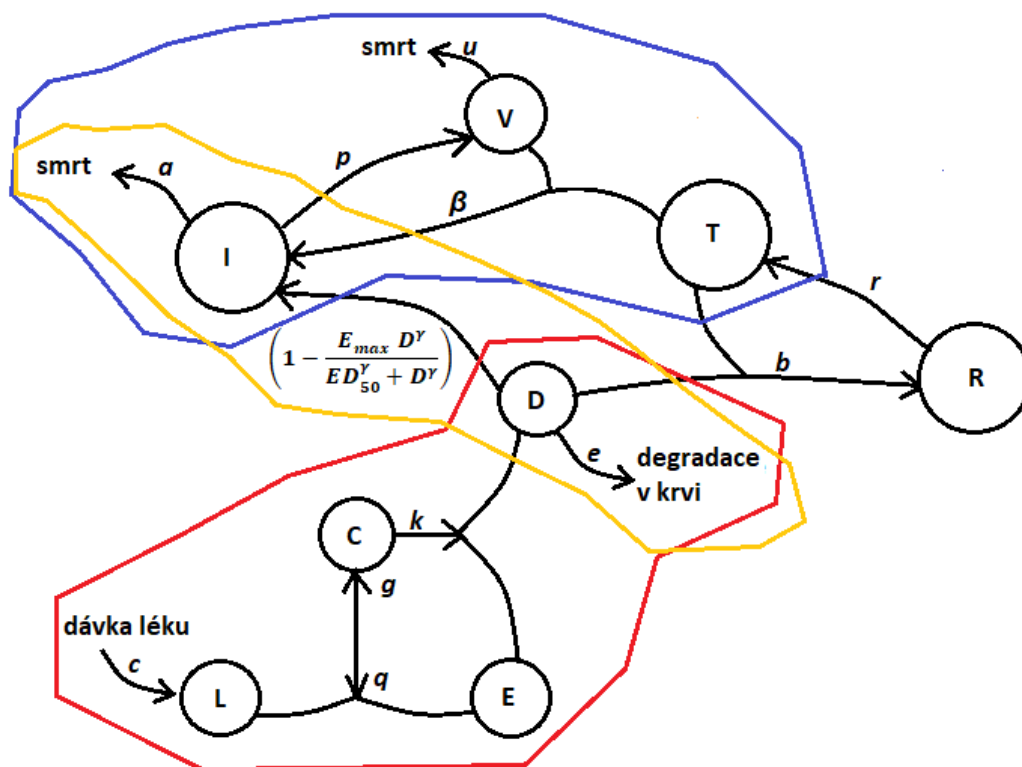
V této kapitole diplomové práce jsem vytvořila matematický model, který propojuje oblasti matematického modelování popsané výše a na který aplikuji již získané vědomosti.

Vycházela jsem ze základního modelu popisujícího průběh chřipkové infekce, a sice:

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

V těle se tedy kromě zdravých buněk T nacházejí také infikované buňky I , které s rychlostí p produkují volné viriony V . S rychlostí β napadají tyto viriony zdravé buňky, které se stávají infikovanými. Parametry a, u jsou rychlosti umírání příslušných složek modelu. Na obrázku 5.1 vidíme tuto část modelu ohraničenou modrou barvou.

Dále jsem do modelu přidala léčbu infekce. Do těla jsem kontinuálně přidávala lék D konstantní rychlostí c , pro který jsem uvažovala jednosložkovou kinetiku. Zároveň pro popis účinku léku uvažuji sigmoidální E_{max} model, který také už známe z předchozí kapitoly. Podívejme se,



Obrázek 5.1: Schéma vlastního modelu (5.1) - (5.4) skládajícího se ze základního modelu chřipkové infekce (modrá), z farmakologického modelu (žlutá) a z modelu popisujícího enzymatickou kinetiku (červená).

jak se model změnil:

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

kde e je rychlost degradace léku v krvi. Maximální účinek léku je popsán parametrem E_{max} , koncentrace léku, při níž je dosaženo poloviny maximálního účinku, je ED_{50} a parametr γ je počet molekul účinné látky léku D . V obrázku 5.1 je tato část modelu znázorněna žlutou barvou.

Tím bych měla propojeny dvě oblasti modelování, kterým je práce věnována. Abych do modelu zakomponovala i oblast modelování kinetiky enzymatických reakcí, spekulovala jsem, že aby se mohla léčivá látka D vázat na receptory infikovaných buněk, a tím snížila produkci virionů, musí nejprve podaná látka L reagovat s enzymem E a tím se aktivovat. Rychlostní konstanta reakce podaného léku s enzymem za vzniku komplexu lék-enzym C je g , rychlostní konstanta zpětné reakce je q . Komplex se rozpadá na aktivovaný lék D a enzym s rychlostí k . K modelu (5.2) tak musím přidat tři rovnice popisující změny v množství podaného léku L , enzymu E a

komplexu lék-enzym C . Podívejme se na novou soustavu:

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

Na obrázku 5.1 vidíme tyto děje vyznačeny červenou barvou, podařilo se mi tedy propojit všechny tři vybrané oblasti matematického modelování. Podívejme se na poslední část obrázku, která není barevně vyznačena.

Posledním procesem přidaným do modelu je, že aktivní forma léku může také působit na zdravé buňky a způsobit tak jejich dočasnou odolnost vůči infekci. Tyto rezistentní buňky R vznikají s rychlostí b a s rychlostí r se opět stávají náchylnými k infekci, tedy buňkami cílovými.

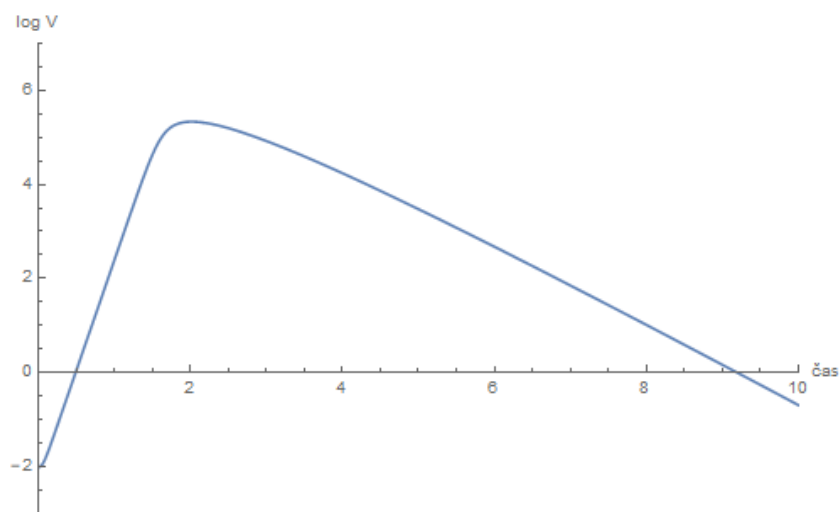
Výsledný model je následující:

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

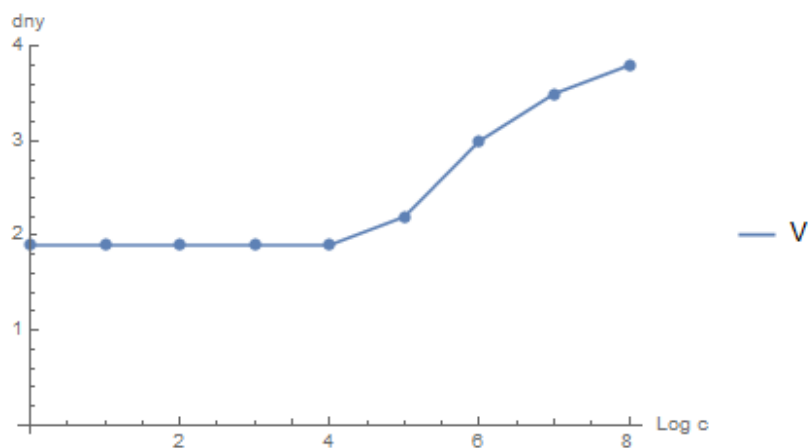
Při simulacích jsem používala model, který požaduje aktivaci léku, nicméně lék působí pouze na infikované buňky, tedy model (5.3). Hodnoty parametrů, pro něž byly simulace provedeny, jsou uvedeny v tabulce 5.1.

Podívejme se nejprve na výsledek simulace modelu (5.1), který vidíme na obrázku 5.2. Na obrázku je znázorněn průběh změn množství virionů během nákazy v závislosti na čase. Vidíme, že přibližně druhý den nákazy je v organismu přítomno nejvíce virionů, poté jejich množství klesá. Obdobné křivky jsem vykreslovala i pro model (5.3) a sledovala přitom vliv rychlosti c , s jakou je lék kontinuálně přiváděn do těla. Simulovala jsem hodnoty pro c od 10^0 až do 10^8 . Vzhledem k obrovskému počátečnímu počtu zdravých buněk T_0 a naopak malému počátečnímu množství volných virionů V_0 došlo k výrazné změně polohy vrcholu populace virionů až při hodnotě $c = 10^5$ (obr. 5.3).

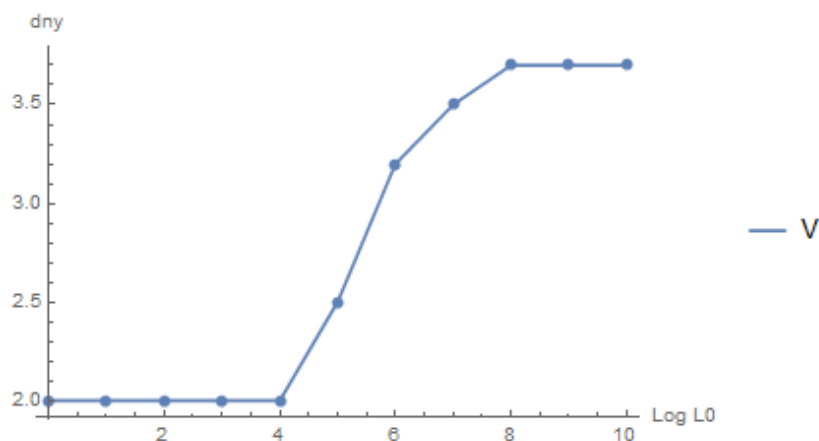
Dalším simulovaným případem byla situace, kdy je do těla aplikován lék pouze na počátku simulace. Simulovala jsem hodnoty L_0 od 10^0 až do 10^{10} . Při počátečních koncentracích léku od hodnoty 10^0 až po hodnotu 10^4 dosáhla populace virionů maxima vždy druhý den infekce. Od hodnot $L_0 = 10^5$ se vrchol infekce postupně posouval směrem doprava. Od hodnoty $L_0 = 10^8$



Obrázek 5.2: Časový průběh změn v množství virionů během nákazy popsané modelem (5.1) pro parametry uvedené v tabulce 5.1.



Obrázek 5.3: Vliv konstantní rychlosti kontinuálně dodávaného léku c na čas, kdy populace virionů v organismu dosáhne maxima, počáteční koncentrace léku $L_0 = 0$.



Obrázek 5.4: Vliv počáteční koncentrace léku L_0 na čas, kdy populace virionů v organismu dosáhne maxima, rychlost kontinuálně dodávaného léku $c = 0$.

se den, kdy populace virionů dosáhne maxima, ustálil na čtvrtém dni a s přibývajícím koncentrací léku se to nezměnilo (obr. 5.4). Vzhledem k počátečnímu množství buněk $T_0 = 4 \cdot 10^8$ je to očekávané chování.

parametr	význam	hodnota	jednotky
T_0	počáteční množství zdravých buněk	$4 \cdot 10^8$	
V_0	počáteční množství virionů	10^{-2}	
β	rychlost infekce	$1.3 \cdot 10^{-4}$	$[(\text{TCID}_{50}/\text{ml})^{-1}\text{den}^{-1}]$
a	rychlost zániku infikovaných buněk	2.1	den^{-1}
p	rychlost vzniku virionů	$3.2 \cdot 10^{-3}$	$[(\text{TCID}_{50}/\text{ml})^{-1}\text{den}^{-1}]$
u	rychlost zániku virionů	2.1	den^{-1}
b	rychlost, s jakou se neinfikované buňky stávají odolné vůči infekci	10^{-4}	den^{-1}
c	rychlost kontinuálního dodávání léku	10^0 až 10^8	h^{-1}
L_0	počáteční koncentrace léku	10^0 až 10^{10}	mg/l
g	rychlostní konstanta reakce léku s enzymem	0.1	h^{-1}
q	rychlostní konstanta rozpadu komplexu lék-enzym na výchozí látky	10^2	h^{-1}
k	rychlostní konstanta rozpadu komplexu lék-enzym na aktivovaný lék a enzym	10^4	h^{-1}
e	rychlost degradace léku v krvi	0.1	h^{-1}
E_{max}	maximální účinek léku	0.7	–
γ	Hillův koeficient	1	–
ED_{50}	koncentrace léku, kdy je dosaženo poloviny maximálního účinku	10^5	

Tabulka 5.1: Přehled parametrů použitých v simulaci vytvořeného modelu (5.3), data čerpána z (Baccam et al., 2006).

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, virové infekce a modely farmakokinetickodynamické. V rámci každé z těchto kapitol je popsán základní model, následně uvádím 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 model, který všechny tři studované oblasti propojuje. Do těla je vpraven lék, který se aktivuje enzymem a následně působí na infikované (i zdravé) buňky. Zkoumala jsem vliv rychlosti, s jakou je lék kontinuálně dodáván do těla, na populaci virionů. Zajímal mě čas, kdy bude populace virionů v těle maximální. Tento čas jsem sledovala také pro různé počáteční množství léku při jeho jednorázovém podání.

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 biologii či chemiky, může sloužit jako studijní materiál pro matematicko-biologické semináře. První cíl se tedy podařilo naplnit. Co se týče druhého cíle, model jsem vytvořila, představila jsem myšlenkové pochody, které vedly k jeho vytvoření. Představený model by se dal rozšířit mnoha dalšími směry, například uvažováním doby latence u infikovaných buněk či možnou reakcí nějakého aktivátoru či inhibitoru s enzymem.

Literatura

- 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.
- 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.
- Bonhoeffer, S., R. M. May, G. M. Shaw and M. A. Nowak. 1997. Virus dynamics and drug therapy. *Medical Science* 94:6971–6976.
- Cain, J. W. 2014. Chemical reaction kinetics: mathematical underpinnings. *Molecular Life Sciences*.
- 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.
- 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.
- Higham, D. J. 2008. Modeling and simulating chemical reaction. *SIAM Review* 50:347–368.

- Klipp, E., R. Herwig, A. Kowald, C. Wierling and H. Lehrach. 2005. *Systems biology in practice: concepts, implementation and application*. Weinheim: Wiley-Vch.
- Macheras, P. and A. Iliadis. 2006. *Modeling in biopharmaceutics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics: homogeneous and heterogeneous approaches*. New York: Springer.
- 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.
- Murray, J. D. 2003. *Mathematical biology*. New York: Springer.
- Nielsen, E. I. and L. E. Friberg. 2013. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacological Reviews* 65:1053–1090.
- Nowak, M. A. and M. Bangham, Charles R. 1996. Population dynamics of immune responses to persistent viruses. *Science* 272:74–79.
- Šípál, Z., P. Anzenbacher, P. Peč, J. Pospíšil and I. Růžička. 1992. *Biochemie*. Státní pedagogické nakladatelství Praha.
- 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.
- Perelson, A. S. 2002. Modeling viral and immune system dynamics. *Nature Reviews Immunology* 2:28–36.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- Vu, T., P. Ma, S. Chenm Jiyun, J. Hoon, A. V. Hecken, L. Yan, S. Wu, Liviawati, L. Hamilton and G. Vargas. 2017. Prarmacokinetic-pharmacodynamic relationship of erenumab (AMG 334) and capsaicin-induced dermal blood flow in healthy and migraine subjects. *Pharmaceutical Research* 34:1784–1795.