



Středoškolská technika 2023

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Matematické modelování vlivu remdesiviru a meflochinu na průběh virového onemocnění COVID-19 na buněčné úrovni

Vojtěch Belada

První soukromé jazykové gymnázium

Brandlova 875, Hradec Králové

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

.....

V Hradci Králové dne 14. ledna 2023

Vojtěch Belada

Poděkování

Rád bych poděkoval zejména mé hlavní konzultantce, která mi nejenom pomohla celé téma zpracovat, ale také mi ho nabídla. Bez její pomoci by tato práce nemohla být zpracována.

Rád bych dále poděkoval mému vedoucímu práce, RNDr. Michalovi Hruškovi, který mi pomohl dát celé práci strukturu a smysl.

Anotace

BELADA, Vojtěch. *Matematické modelování vlivu remdesiviru a meflochinu na průběh virového onemocnění COVID-19 na buněčné úrovni*. Hradec Králové, 2023. STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST. První soukromé gymnázium v Hradci Králové. Vedoucí práce Veronika Bernhauerová, Michal Hruška. 68 s.

První část práce *Matematické modelování vlivu remdesiviru a meflochinu na průběh virového onemocnění COVID-19 na buněčné úrovni* se zaměřuje na obecné porovnání průběhu akutního virového onemocnění na tzv. Vero buňkách při použití dvou základních typů antivirotik – inhibitorů virové infekce a inhibitorů produkce virových jednotek. Další částí práce je fitování křivky řídící se podle Hillovy rovnice na datové body získané ze studií, ve kterých se měřila účinnost remdesiviru a meflochinu na redukcii virové nálože při jejich různých koncentracích. Systém čtyř diferenciálních rovnic popisujících průběh akutního virového onemocnění na Vero buňkách je fitován na data popisující změny virové nálože v průběhu času. Během zmíněných procesů jsou odhadovány parametry onemocnění a léků, které jsou následně použity k zjištění vlivu remdesiviru a meflochinu na průběh onemocnění COVID-19. Sledovány jsou účinky meflochinu a remdesiviru na populace zdravých buněk, latentních buněk, infekčních buněk a jejich vliv na míru virové nálože a výsledky jsou na závěr práce porovnávány.

Klíčová slova: Matematické modelování, COVID-19, remdesivir, meflochin, Hillova rovnice

Annotation

BELADA, Vojtěch. *Mathematical modelling of the effects of remdesivir and mefloquine on the dynamics of viral infection COVID-19 in vitro*. Hradec Králové, 2023. Thesis competition SOČ at First Private Language Grammar School of Hradec Králové. Thesis Supervisor Veronika Bernhauerová, Michal Hruška. 68 p.

The first part of this thesis is focused on the general comparison of the effects of two basic types of viral inhibitors, the inhibitor of viral infection and the inhibitor of viral particle production, on the dynamics of viral infection in Vero cells. The following part describes the process of fitting the Hill function to datapoints obtained from experiments, in which the inhibitory efficacy of remdesivir and mefloquine at their different concentrations on the viral load was measured. The process of curve fitting is also applied to a series of datapoints describing the dynamics of the viral load during a COVID-19 infection. However, this time a system consisting of four differential equations designed to describe the dynamics of an acute viral infection on Vero cells is being used instead of the Hill function. Another essential result of curve fitting are the values of parameters of remdesivir, mefloquine and the viral infection. Those are later used in order to compare the effects of mentioned drugs on each tracked component – uninfected cells, latent cells, infectious cells and viral load.

Keywords: Mathematical modelling, COVID-19, remdesivir, mefloquine, Hill function

OBSAH

Úvod a cíl práce	11
1 Viry	12
1.1 Virová replikace	12
1.1.1 Přichycení	12
1.1.2 Průnik.....	12
1.1.3 Svlékání virionu.....	13
1.1.4 Replikace	13
1.1.5 Sestavování.....	13
1.1.6 Zrání.....	14
1.1.7 Uvolnění.....	14
1.2 Průběh virového onemocnění.....	14
1.2.1 Zásah virového onemocnění do reprodukčního cyklu buňky.....	15
1.1 COVID-19.....	16
2 Antivirotika.....	16
2.1 Specifická antivirotika a jejich mechanismy.....	17
2.1.1 Remdesivir.....	17
2.1.2 Meflochin.....	17
3 In vitro studie	18
3.1 Vero buňky.....	18
4 Matematická biologie	19
4.1 Matematická ekologie	19
5 Matematické modelování biologických dat.....	21
5.1 Matematické modelování.....	21
5.1.1 Formulace	21
5.1.2 Řešení.....	21
5.1.3 Interpretace	21
5.2 Diferenciální rovnice.....	22
5.3 Fitování křivky na data.....	22
5.4 Hillova rovnice.....	23
6 Hypotézy.....	25

7	Metodika	26
	Výběr dat.....	26
	Řešení a vykreslování základního modelu bez léčiva	26
	Řešení a vykreslování účinnosti léčiva v závislosti na jeho koncentraci	27
	Kombinace účinnosti léčiva se základním modelem bez léčiva.....	29
	Extrakce dat z grafu popisující účinnost léku při jeho různých koncentracích	29
	Dopočítávání reálných parametrů léčiva z dat.....	30
	Dopočítávání reálných parametrů onemocnění z dat.....	31
8	Tvorba matematických rovnic	33
	8.1 Základní matematický model onemocnění	33
	8.2 Rozšířený matematický model onemocnění	35
	8.3 Odvození reprodukčního čísla.....	37
	8.4 Matematický model účinnosti léčiv	39
	8.4.1 Matematický model vztahu Michaelis-Mentenové.....	39
	8.4.2 Matematický model Hillovy rovnice	39
9	Modelování.....	40
	9.1 Modelování základního matematického modelu onemocnění.....	40
	9.2 Modelování účinnosti léčiva v závislosti na jeho koncentraci.....	41
	9.2.1 Modelování vztahu Michaelis-Mentenové	41
	9.2.2 Modelování Hillovy rovnice.....	42
	9.3 Rozšířený model onemocnění.....	44
	9.3.1 Porovnání základního modelu onemocnění s modely rozšířenými o inhibitor virové infekce a inhibitor produkce virových jednotek	44
10	Odhadování reálných parametrů léčiv	48
	10.1 Odhadování reálných parametrů inhibitorů produkce virových jednotek....	48
	10.1.1 Extrakce dat z grafu popisujícího účinnost remdesiviru při jeho různých koncentracích	48
	10.1.2 Dopočítávání reálných parametrů remdesiviru z dat	49
	10.1.3 Modelování účinnosti remdesiviru v závislosti na jeho koncentraci.....	50
	10.2 Odhadování reálných parametrů inhibitorů virové infekce.....	50
	10.2.1 Extrakce dat z grafu popisujícího účinnost meflochinu při jeho různých koncentracích	51
	10.2.2 Odhadování reálných parametrů meflochinu z dat	51

10.2.3	Modelování účinnosti meflochinu v závislosti na jeho koncentraci.....	52
11	Odhadování reálných parametrů onemocnění COVID-19	53
11.1	Modelování onemocnění COVID-19 za použití reálných parametrů.....	54
12	Vliv léčiv na průběh onemocnění COVID-19	56
12.1	Porovnávání vlivů meflochinu a remdesiviru na průběh virového onemocnění COVID-19	56
12.1.1	Porovnávání populací zdravých buněk	57
12.1.2	Porovnávání populací latentních buněk	58
12.1.3	Porovnávání populací infekčních buněk.....	59
12.1.4	Porovnávání virových náloží	60
	Diskuze	61
	Závěr	63

Seznam grafů

Graf 1 – Příklad algoritmu nejmenších čtverců na lineární křivce	23
Graf 2 – Průběh základního modelu onemocnění za použití pouze ilustračních parametrů	40
Graf 3 – Závislost účinnosti léčiva fungujícího na bázi vztahu Michaelis-Mentenové na hodnotě parametru half-saturation constant K a koncentraci léčiva C	42
Graf 4 – Závislost účinnosti léčiva fungujícího na bázi Hillovy rovnice na hodnotě Hillovy konstanty n , half-saturation constant K a koncentrace léčiva C	43
Graf 6 – Vyobrazení vlivů inhibitoru virové infekce a inhibitoru produkce virových jednotek na populaci latentních buněk L a jejich porovnání s vývojem populace latentních buněk L v základním modelu onemocnění (bez léčiva)	45
Graf 5 – Vyobrazení vlivů inhibitoru virové infekce a inhibitoru produkce virových jednotek na populaci zdravých buněk S a jejich porovnání s vývojem populace zdravých buněk S v základním modelu onemocnění (bez léčiva)	45
Graf 7 – Vyobrazení vlivů inhibitoru virové infekce a inhibitoru produkce virových jednotek na populaci infekčních buněk I a jejich porovnání s vývojem populace infekčních buněk I v základním modelu onemocnění (bez léčiva)	46
Graf 8 – Vyobrazení vlivů inhibitoru virové infekce a inhibitoru produkce virových jednotek na virovou nálož V a jejich porovnání s vývojem populace virové nálože v základním modelu onemocnění (bez léčiva)	47
Graf 9 – Křivka řídící se podle Hillovy rovnice nafitována na původní datové body remdesiviru	50
Graf 10 – Křivka řídící se podle Hillovy rovnice nafitována na původní datové body meflochinu (použita kladná hodnota Hillovy konstanty n)	52
Graf 11 – Křivky řídící se podle systému diferenciálních rovnic (4) nafitované na původní datové body popisující průběh onemocnění COVID-19	54
Graf 12 – Vyobrazení modelů vývoje populací zdravých buněk S v průběhu onemocnění COVID-19 při různých koncentracích meflochinu a remdesiviru a jejich porovnání s modelem vývoje populace zdravých buněk S v průběhu onemocnění COVID-19 bez použití léčiva	57
Graf 13 – Vyobrazení modelů vývoje populací latentních buněk L v průběhu onemocnění COVID-19 při různých koncentracích meflochinu a remdesiviru a jejich porovnání s modelem vývoje populace latentních buněk L v průběhu onemocnění COVID-19 bez použití léčiva	58
Graf 14 – Vyobrazení modelů vývoje infekčních buněk I v průběhu onemocnění COVID-19 při různých koncentracích meflochinu a remdesiviru a jejich porovnání s modelem vývoje infekčních buněk I v průběhu onemocnění COVID-19 bez použití léčiva	59
Graf 15 – Vyobrazení modelů vývoje virové nálože v průběhu onemocnění COVID-19 při různých koncentracích meflochinu a remdesiviru a jejich porovnání s modelem vývoje virové nálože v průběhu onemocnění COVID-19 bez použití léčiva	60

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Vývoj akutních a perzistentních virových onemocnění – (BOLDOGH, 1996)	15
Obrázek 2 – Závislost inhibice virových jednotek na použité koncentraci remdesiviru (zdroj datových bodů) – (SCHOOLEY et al., 2021)	49
Obrázek 3 – Závislost výskytu infekčních virových jednotek na použité koncentraci meflochinu (zdroj datových bodů) – (SHIONOYA, 2021)	51
Obrázek 4 – Průběh virového onemocnění COVID-19 (zdroj datových bodů) – (BERNHAEUEROVÁ, 2021).....	53

ÚVOD A CÍL PRÁCE

S modernizací výpočetní techniky se do popředí začala dostávat práce s daty, která je schopná objevit nové přístupy k problémům a objasnit řadu souvislostí mezi různými jevy. Jedním ze způsobů práce s daty je i matematické modelování, které má schopnost predikovat vývoj různých procesů. Je též aplikovatelné i na témata zasahující do oborů jako je virologie.

Jednou z celosvětově významných událostí v oboru virologie byla v poslední době pandemie onemocnění COVID-19 způsobené koronavirem SARS-CoV-2. Během pandemie bylo prováděno velké množství výzkumů a měření a následně publikována řada studií v buněčných kulturách popisujících růst nálože SARS-CoV-2 v čase. Dále byl zkoumán vliv různých léčivých látek na množství virové nálože. Prováděná měření nicméně bývají prováděna jen v jednom časovém bodě v průběhu buněčné infekce, obvykle 48 až 72 hodin po infekci buněk virem, a tím pádem neumožňují pozorování vlivu látky na celkový průběh tohoto onemocnění. Dále, tato měření ovšem obvykle sledují jen virovou nálož při určitých dávkách látek. Růst virové nálože SARS-CoV-2 za přítomnosti léčiva nám pomáhá objasnit matematické modelování, které může být v řešení těchto a podobných problémů velmi užitečným nástrojem. Pomocí matematických modelů a experimentálních dat jsme schopni predikovat, jakým způsobem se bude onemocnění vyvíjet.

Během pandemie byly testovány léky dvou antivirových typů – inhibitory produkce virových jednotek a inhibitory virové infekce. Matematické modelování zde opět může být užitečné, jelikož je schopno objasnit rozdílnosti vlivů těchto dvou kategorií antivirotik na onemocnění při stejných účinnostech.

K hlavním cílům této práce patří:

- porovnání vlivů inhibitorů produkce virových jednotek a inhibitorů virové infekce na průběh akutního virového onemocnění při jejich stejných účinnostech,
- zjištění účinnosti inhibitoru produkce virových jednotek (remdesiviru) a inhibitoru virové infekce (meflochinu) při jejich libovolných koncentracích,
- charakteristika průběhu růstu virové nálože SARS-CoV-2 v čase,
- porovnání účinků meflochinu a remdesiviru na průběh virového onemocnění COVID-19 v libovolném časovém úseku.

Hlavním důvodem volby této práce, jejíž klíčovou částí je matematické modelování virového onemocnění, je propojení všech kategorií přírodních věd, které toto téma nabízí. Také mě vždy zajímala představa popisování a predikce vývoje jevů podle již známých vlastností zúčastněných prvků.

V teoretické části jsou popsány postupy a informace, které jsou potřebné ke správnému provedení procesů popsaných v části praktické.

Teoretická část práce

1 VIRY

Viry jsou nebuněčné parazitické částice, které se skládají z nukleové kyseliny, okolo které je proteinový obal. Některé viry také mohou mít jeden či více bičků, membránový obal nebo enzymy, které jsou uloženy ve zmíněném proteinovém obalu nazývaném kapsida, a které slouží k reprodukci viru. Na povrchu virového obalu, který vzniká vypučením virové kapsidy, se nachází glykoproteiny. Ty jsou důležité pro navázání virů na specifické receptory buněk. Tyto buňky jsou nezbytné pro reprodukci viru, který bez nich zůstává neaktivní (ŠÍPEK, 2014). Kvůli této vlastnosti se viry též klasifikují jako neživé (KEJNOVSKÝ, 2017).

1.1 Virová replikace

Virová replikace je proces, při kterém viry využívají hostitelské buňky za cílem tvorby nových virových částic. Tento mechanismus lze rozdělit na sedm různých fází (LOUTEN, 2016).

1. Přichycení
2. Průnik
3. Svlékání virionu
4. Replikace
5. Sestavování
6. Zrání
7. Uvolnění

1.1.1 Přichycení

Při fázi přichycení, které se též říká adheze či adsorpce, se virus přichytává na hostitelskou buňku. Ta obvykle interaguje s mimobuněčným prostředím pomocí plazmatické membrány, z které vyčnívá množství různých bílkovin. Cytoplazmatické membrány mají širokou škálu funkcí, mezi které patří například transport iontů a molekul, vazba jedné buňky na druhou či působení jako receptory pro přichozí proteiny (LOUTEN, 2016).

Právě tyto povrchové receptory virus využívá k tomu, aby se na buňku přichytil. Obsahuje speciální bílkoviny, které umožňují virionu (základní částice viru schopná infikovat hostitelskou buňku) přichycení na buňku a její následné využití (CANN, 2008).

1.1.2 Průnik

V případě úspěšného provedení prvního kroku se virus snaží dostat do vnitřního prostředí buňky. Rychlost tohoto kroku zvyšuje úspěšnost infekce buňky, jelikož obranné

mechanismy, jako například proudění hlenu, mají schopnost virus efektivně odstranit (LOUTEN, 2016).

Jako průnik je následně označován samotný přechod viru přes povrchovou biomembránu buňky. Tento proces ovšem vyžaduje energii, kterou mu dodává samotná buňka. Toho virus dosáhne využitím jedné z obvyklých funkcí buňky, jakou je například endocytóza (CANN, 2008).

1.1.3 Svlékání virionu

Cílem svlékání virionu, procesu, při kterém se odstraňuje či rozpadá kapsida viru, je proniknutí virového genomu do místa v buňce, kde se odehrává transkripce a replikace genomů. Specifický mechanismus svlékání je často úzce spojen s průnikem viru do buňky, jako je tomu například u rhinovirů, které již při procesu endocytózy využívají jednoho z přítomných proteinů pro uvolnění genomu viru do buňky (CANN, 2008).

Některé viry jsou v případě, že se příslušné místo replikace a transkripce nachází příliš daleko od cytoplasmatické membrány, schopné využít molekulových motorů pro přepravu. Tohoto mechanismu využívají například herpesviry, které se pro přepravu k jádru buňky mohou navázat na proteinový motor dynein (CANN, 2008).

1.1.4 Replikace

Genom viru při replikaci sehraává funkci manuálu, podle kterého se syntetizují virové proteiny. Bílkoviny, ze kterých budou sestaveny budoucí viriony, jsou vyrobeny procesem exprese virového genomu, který probíhá procesem replikace. Mechanismus tohoto procesu závisí na typu kopírovaného genomu nukleové kyseliny. Široká škála virů pro replikaci využívá buněčných proteinů. Umístění těchto makromolekul tedy bude většinou udávat lokaci samotné replikace. Podle Baltimorovy klasifikace rozeznáváme celkem sedm typů virů (CANN, 2008):

1. Double-stranded DNA viruses (dsDNA viry)
2. Single-stranded DNA viruses (ssDNA viry)
3. Double-stranded RNA viruses (dsRNA viry)
4. Positive-sense RNA viruses (ssRNA viry s pozitivní polaritou)
5. Negative-sense RNA viruses (ssRNA viry s negativní polaritou)
6. RNA viruses that reverse transcribe (ssRNA viry s reverzní transkriptázou)
7. DNA viruses that reverse transcribe (dsDNA viry s reverzní transkriptázou)

1.1.5 Sestavování

Viry jsou sestavovány z nově syntetizovaných komponent. Pro zahájení procesu, který je často velmi úzce spojený s maturací a uvolněním viru, je důležité shromáždění materiálů na jednom místě. Právě tam bude sestavování probíhat. Takovým místem může být

například Golgiho komplex (aparát), plasmatická membrána či jádro buňky, které je z uvedených možností nejčastější. V takovém případě se bílkoviny dostanou do jádra přes jaderné póry. Po sestavení je ovšem často vlastní DNA viru příliš objemná na zpětnou transportaci přes jaderné póry. Tento problém některé viry řeší překročením dvoumembranového jaderného obalu, zatímco jiné viry pro únik z jádra využívají lýzu či apoptózu (CANN, 2008).

1.1.6 Zrání

Proces zrání (též nazývaný maturace) nastává, jakmile jsou všechny potřebné bílkoviny zabalené v kapsidě. Kdyby nastala destrukce buňky, viry, které dosud nepodstoupily proces maturace, by nebyly schopné zahájit infekci nových buněk (LOUTEN, 2016).

Při zrání se virionové částice stávají infekčními. Časté jsou například strukturální změny v kapsidě, které jsou zprostředkované specifickými enzymy (LOUTEN, 2016).

1.1.7 Uvolnění

Uvolnění virionů do extracelulárního prostředí je posledním krokem v replikačním cyklu viru. V závislosti na typu viru může uvolnění probíhat několika různými způsoby (LOUTEN, 2016).

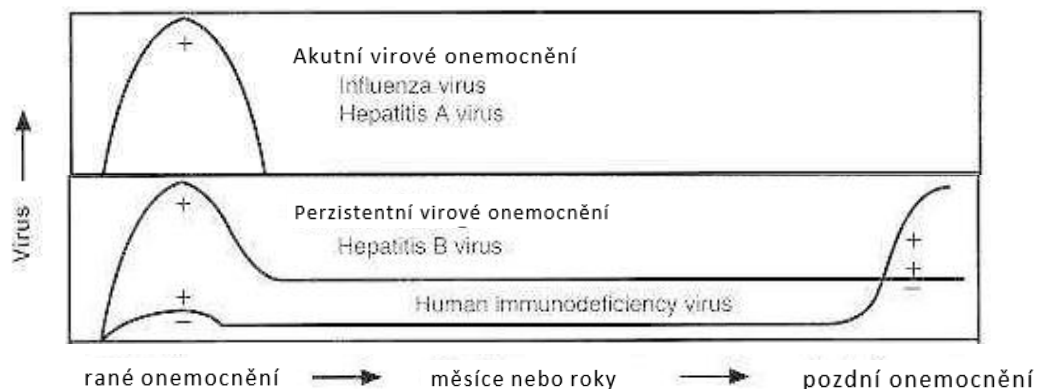
Jedním z nich je pučení, které se vyskytuje u virů, jejichž je obal je utvořen z plasmatické membrány. Jejich sestavování typicky probíhá na vnitřní vrstvě plasmatické membrány, do níž virus zabudovává své plasmatické proteiny. Virální kapsidové proteiny jsou schopné způsobit zakřivení plasmatické membrány okolo kapsidy, což pokračuje, dokud plasmatická membrána není kompletně obalená okolo viru. Po dokončení tohoto procesu je virus vypuštěn ven z buňky (CANN, 2008).

Dalšími způsoby uvolnění viru z buňky jsou lýza buněčné membrány a exocytóza (LOUTEN, 2016).

1.2 Průběh virového onemocnění

Průběh virového onemocnění můžeme charakterizovat několika způsoby. Jedním z nich je rozdělení podle délky trvání, kde můžeme virové onemocnění rozdělit na perzistentní a akutní virová onemocnění (BOLDOGH et al., 1996).

Akutní virové chronické onemocnění je charakteristické rychlým nástupem a krátkým trváním, které se obvykle pohybuje v řádu dnů. Obvykle je takové onemocnění též doprovázeno brzkou tvorbou infekčních virionů a rychlou eliminací infekce imunitním systémem. Mezi typické příklady akutních virových onemocnění patří COVID-19, MERS-CoV, virus Zika, rhinovirus či chřipka (RACANIELLO, 2009).



Obrázek 1 – Vývoj akutních a perzistentních virových onemocnění – (BOLDOGH, 1996)

Perzistentní virové onemocnění je na druhou stranu charakteristické pokračující přítomností infekčního viru po primární infekci. Mezi příklady tohoto typu onemocnění patří syndrom získaného selhání imunity AIDS, chronická hepatitida B nebo C, subakutní sklerotizující panencefalitida a další (BOLDOGH et al., 1996).

Další způsob rozdělení virových infekcí je podle části těla, kterou buňky napadají. Mezi nejčastější patří respirační virové onemocnění. Ty se zaměřují na dýchací soustavu člověka, do které se řadí například hrdlo, dýchací cesty nebo plicní sklípky (BOLDOGH et al., 1996).

1.2.1 Zásah virového onemocnění do reprodukčního cyklu buňky

Inhibice reprodukčního cyklu hostitelské buňky je běžně způsobena velkým množstvím virů. Tento postup virům pomáhá při tvoreni ideálního stavu v hostitelské buňce pro jejich replikaci (KRAMER et al., 2021).

Reprodukční cyklus hostitelské buňky jsou schopny viry přerušit ve specifický moment, který je výhodný pro jejich reprodukční cyklus. Řada DNA virů, mezi které se řadí například Herpesviry, vyvolává inhibici za účelem získání materiálů pro replikaci DNA, o které by normálně musela soutěžit s hostitelskou buňkou. Existuje též řada spekulací ohledně přínosů, které má inhibice reprodukčního cyklu buňky pro RNA viry. Mezi možné přínosy patří účinnost replikace, translace a sestavování viru (KRAMER et al., 2021).

1.1 COVID-19

Jelikož je práce založená především na modelování vlivu různých léčiv na průběh virového onemocnění COVID-19, bude tato infekce popsána podrobněji. Jak už z názvu vyplývá (SARS = severe acute respiratory syndrome), jedná se o akutní respirační virové onemocnění. Inkubační doba je obvykle v řádu 5-6 dní. Po jejím uplynutí se pacienti stávají vysoce infekčními. Průběh onemocnění je obvykle mírný a pro zotavení není potřeba specializované léčby. U určitých skupin lidí může být průběh onemocnění horší, v nejtěžších případech může hrozit i smrt. Do této skupiny patří zejména starší lidé s dlouhodobými zdravotními problémy (např. kardiovaskulární onemocnění, cukrovka, chronická respirační onemocnění nebo rakovina). Mezi nejčastější symptomy onemocnění patří horečka, kašel, únava či ztráta chuti nebo čichu (WHO, 2019).

2 ANTIVIROTIKA

Antivirotika jsou léčiva, která mají schopnost léčit virová onemocnění. Toho docilují dvěma různými způsoby. Mohou být zaměřeny na samotný virus zapříčiňují infekci nebo na hostitelské buňky (VARDANYAN et. al, 2016).

Účinnost antivirotik závisí ve velké míře na jejich koncentraci. Při příliš vysokých koncentracích se ovšem prakticky všechny antivirotika se stávají toxickými (GUENGERICH, 2010).

Antivirotika, která přímo cílí na viry, mohou fungovat řadou různých způsobů, podle kterých se řadí na (VARDANYAN et. al, 2016):

1. inhibitory přichycení – např. oseltamivir, zanamivir
2. inhibitory průniku – např. enfuvirtid, meflochin
3. inhibitory svlékání virionu – např. amantadin, rimantadin
4. inhibitory proteázy – např. ritonavir, darunavir, atazanavir
5. inhibitory polymerázy – např. raltegravir, remdesivir
6. nukleosidové a nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy – např. tenofovir
7. nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy – např. lersivirine
8. inhibitory integrázy – např. raltegravir, elvitegravir, dolutegravir

V této práci jsou antivirotika rozdělována na inhibitory virové infekce a inhibitory produkce virových jednotek, přičemž mezi inhibitory virové infekce se řadí inhibitory přichycení a průniku – brání prvotní infekci buňky. Mezi inhibitory produkce virových jednotek se pak řadí zbytek typů inhibitorů.

2.1 Specifická antivirotika a jejich mechanismy

Účelem této části je charakterizovat specifická antivirotika používaná v léčbě COVID-19 infekce a jejich mechanismy účinku, což je nezbytné k určení správné efektivity daného léčiva v modelu. Léčiva rozebíraná v následujících kapitolách jsou pro tuto práci důležitá kvůli tomu, že právě jejich data jsou použita v praktické části práce.

2.1.1 Remdesivir

Remdesivir funguje na principu inhibice RNA-dependentní RNA polymerázy, což ho řadí mezi inhibitory produkce virových jednotek. Jeho účinky byly testovány především v souvislosti s nemocemi MERS-CoV a COVID-19. Látka způsobuje pokles replikace virálního genomu a jeho produkce kvůli změně ve funkci virové exonukleázy a narušené schopnosti opravy. Remdesivir je často doporučován pro pacienty s onemocněním COVID-19, jelikož je schopen zabránit výraznému zhoršení stavu pacienta kvůli své schopnosti snižování rychlosti replikace viru (KAUSAR et al., 2021).

2.1.2 Meflochin

Ačkoliv se meflochin řadí mezi antimalarika, během pandemie byl též testován jako lék proti onemocnění COVID-19. Důvodem je jeho nevídaně vysoká účinnost. V boji s onemocněním COVID-19 funguje meflochin na principu inhibice průniku, což ho řadí do skupiny inhibitorů virové infekce (SHIONOYA, 2021). Výhodou meflochinu je také jeho vysoká efektivita vůči parazitům a virům, které jsou rezistentní vůči léčivům jako chinin či chlorochin (ANAND, 1997).

3 IN VITRO STUDIE

Zatímco in vivo studie se provádějí na živém organismu, pro in vitro (tj. ve zkumavce) testy či experimenty se používá kontrolované prostředí. Typickým příkladem takového prostředí může být například Petriho miska či zkumavka (ESKE, 2004).

In vitro testování se obvykle koná v laboratoři a většinou hodnotí nějakou formu buněčné populace po dobu daného experimentu. Tento způsob výzkumu populací přináší celou řadu výhod. Jednou z nich je absence rušivých elementů a proměnných, které jsou přítomné v živém organismu. Často je tento způsob výhodný také z toho důvodu, že není potřeba vystavovat jakékoliv živé organismy nebezpečí (ESKE, 2004).

3.1 Vero buňky

Vero buňky jsou upravené ledvinové buňky úzkonosého primáta kočkodana obecného (*Chlorocebus aethiops*). Jejich používání je čím dál častější při in vitro studiích v oborech mikrobiologie, buněčné biologie a molekulární biologie a je opodstatněno jejich četnými výhodami. Mezi ně se řadí snadné zakládání a uchovávání buněčné linie, jejich vysoká stabilita a nízká pravděpodobnost maligního zvratu a vysoká citlivost na široké spektrum virů (SHEN et al., 2019). Vero buňky jsou vysoce citlivé i na viry skupiny SARS, na které je zaměřena praktická část této práce (ESSAIDI-LAZIOSI, 2021). Vero buňky jsou také používané z toho důvodu, že nejsou schopny produkovat interferony, jednu z hlavních složek imunitního systému buňky (YOUNG et al., 2003).

4 MATEMATICKÁ BIOLOGIE

Matematická biologie (též nazývaná biomatematikou či matematickou a teoretickou biologií) je biologický obor, který používá matematické modely a analýzy ke studiu živých organismů. Zaměřuje se zejména na systémy, které řídí strukturu a vývoj uvnitř biologických systémů i biologických systémů samotných (BAYLISS et al., 2015).

Počátky matematické biologie se datují až do roku 1202, kdy italský matematik Leonardo Fibonacci publikoval spis, který představil hindsko-arabskou číselnou soustavu západní Evropě. Jeden z jím uvedených příkladů se zaměřoval na vývoj populace králíků za stanovení počátečních podmínek. Právě tato úloha je považována za začátek matematické biologie (NOWAK et al., 2000).

Další výrazný posun ve světě matematické biologie nastal v roce 1894, kdy zoolog Walter Weldon konstatoval, že Darwinova teorie je ve skutečnosti teorií matematickou. Jediným způsobem, jak teorii otestovat, byla podle něho aplikace matematických a statistických nástrojů. V reakci na toto prohlášení byla Walterem Weldonem vytvořena samostatná věda, která nese název biometrie a zabývá kvantitativní měřeními v biologii a následnou analýzou výsledků (NOWAK et al., 2000).

Na Darwinovu teorii navazovali v první polovině 20. století také Ronald Fisher, J. B. S. Haldane a Sewall Wright, kteří dokázali pomocí užití matematické biologie vyvrátit její neslučitelnost se zákony genetiky. Kvůli těmto úspěchům jsou právě oni považováni za zakladatele matematické biologie (NOWAK et al., 2000).

4.1 Matematická ekologie

Obor matematické ekologie byl prve zkoumán italským biologem Umbertem D'Anconou, který studoval důvody úbytku ryb po první světové válce. Při analýze statistik rybího trhu zjistil, že v průběhu války přibýlo predátorských ryb. Jelikož mu ovšem důvod tohoto jevu byl doposud nejasný, D'Ancona se rozhodl obrátit na svého nevlastního otce Vita Volterra, který byl předním matematikem své doby. Volterra byl následně schopen najít odpovědi k tomuto problému pomocí systému dvou diferenciálních funkcí

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= rx - axy, \\ \frac{dy}{dt} &= bxy - dy.\end{aligned}\tag{1}$$

V první rovnici popisující množství kořisti x v závislosti na čase t se objevuje konstanta r , která popisuje rychlost příbytku kořisti, a rychlost a se kterou je kořist zabíjena predátorskými rybami.

V následující rovnici popisující množství predátorských ryb y v závislosti na čase t se objevuje rychlost růstu populace predátorských ryb b a parametr d , který určuje rychlost, se kterou predátorské ryby umírají.

5 MATEMATICKÉ MODELOVÁNÍ BIOLOGICKÝCH DAT

Matematické modely biologických dat jsou důležité pro jejich schopnost objasnění časových měřítek, účinnosti a mechanismů, které jsou základem virové reprodukce a řešení virové infekce (SMITH, 2018). Tyto vlastnosti matematického modelování jsou hlavním důvodem, proč byl tento postup zvolen pro splnění cílů této práce.

5.1 Matematické modelování

Matematické modelování je definováno jako snaha zkoumat problémy, s kterými se můžeme setkat v reálném životě, za použití matematického jazyka. Obvykle se tento proces rozděluje do tří fází, kterými jsou:

1. Formulace
2. Řešení
3. Interpretace

Výsledkem by měly být konkrétní vztahy, objasňující řešený problém (ANHALT et al., 2015).

5.1.1 Formulace

Ve fázi formulace se snažíme problém analyzovat a najít relevantní parametry, s kterými následně budeme moci pracovat ve fázi následující. Často musíme opomíjet parametry, které nemají zásadní vliv na řešení našeho problému. Tyto parametry se označují jako irelevantní (ANHALT et al., 2015).

5.1.2 Řešení

Cílem této fáze je dojít k vyřešení problému použitím parametrů, které jsme získali v předcházejícím kroku. Pro dosažení stanoveného cíle musíme pomocí předem připravených parametrů sestavit rovnice popisující definovaný problém a následně rovnice vyřešit (ANHALT et al., 2015).

5.1.3 Interpretace

Interpretace je finální fází procesu matematického modelování. Jejím účelem je objasnit, co řešení získané v minulém kroku znamená v kontextu originálního problému (ANHALT et al., 2015).

5.2 Diferenciální rovnice

Diferenciální rovnice jsou definovány jako matematické rovnice obsahující neznámé funkce a jednu či více derivací této neznámé funkce (CUEMATH, 2019).

Derivace představuje míru změny dané funkci. Diferenciální rovnice tudíž dokáže popsat vztah mezi rychlostí změny v kvantitě jednoho prvku v závislosti na kvantitě prvku druhého (CUEMATH, 2019).

Užitek diferenciálních funkcí je patrný při řešení celé řady problémů, mezi které patří zkoumání toku elektřiny, periodického pohybu předmětu či vysvětlování termodynamických jevů. Diferenciální funkce se též ve velké míře používají při tvorbě a popisu matematických modelů růstu populace, radioaktivity a řady dalších jevů. Právě použití diferenciálních rovnic v matematickém modelování bude pro jeho důležitost v praktické části práce jedním ze stěžejních témat (CUEMATH, 2019).

5.3 Fitování křivky na data

Fitování křivky na data je proces, při kterém se snažíme najít funkci, která co nejlépe odpovídá určitému souboru dat. Tento mechanismus má širokou škálu využití, mezi které se řadí například kvantifikace obecného trendu naměřených dat či odstranění šumu z funkce (ANTONIADIS, 2022).

Existuje široká škála vhodných algoritmů pro fitování křivky na data. Nejznámější z nich je metoda simplexová, která využívá algoritmu nejmenších čtverců. Tento algoritmus funguje na bázi hledání takové křivky, aby součet čtverců vzdáleností mezi křivkou a neměřenými daty (tzv. rezidua) byl co nejmenší (ANTONIADIS, 2022).

V základním tvaru bude součet nejmenších čtverců, který budeme označovat písmenem T , mít tvar:

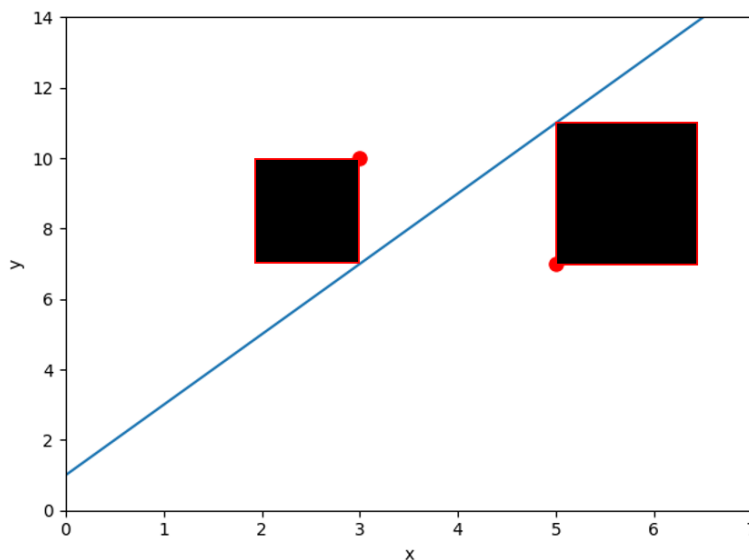
$$T = \sum_{i=1}^N (y_i - y)^2, \quad (2)$$

přičemž data, se kterými pracujeme, mají souřadnice $[x_i; y_i]$ a bod na stejné pozici na ose x , který náleží předpisu funkce, má souřadnice $[x_i; y]$. Tento vztah je poté ještě upraven na funkci, s kterou zrovna pracujeme (ANTONIADIS, 2022).

Například u lineární funkce bude součet těchto čtverců mít tvar

$$T = \sum_{i=1}^N (y_i - (ax_i + b))^2,$$

přičemž data, se kterými pracujeme, mají souřadnice $[x_i; y_i]$ a bod na přímce, který má stejnou x-ovou souřadnici, a který vyhovuje předpisu lineární funkce, má souřadnice $[x_i; ax_i + b]$ (ANTONIADIS, 2022).



Graf 1 – Příklad algoritmu nejmenších čtverců na lineární křivce

Počítače jsou následně schopné pomocí iterativních algoritmů nalézt hodnoty parametrů ‘a’ a ‘b’, pro které bude platit, že tato suma čtverců je nejmenší (ANTONIADIS, 2022).

5.4 Hillova rovnice

V oboru biochemie a farmakologie odkazuje pojem „Hillova rovnice“ na soubor dvou různých rovnic, jejichž rozdíl spočívá v jejich účelech. Zatímco Hillova funkce je používána pro měření buněčné či tkáňové reakce na ligandy, Hill-Langmuirova se zaměřuje na obsazení makromolekul ligandy (GESZTELYI et al., 2013).

Hill-Langmuirova rovnice je kvůli svým vlastnostem často používána v oboru farmakologického modelování k analýze kvantitativních vztahů mezi léčivem a receptory. Velké množství farmakokinetických a farmakodynamických modelů obsahuje právě Hill-Langmuirovu funkci k popisu nelineárního vztahu mezi koncentrací léčiva a její účinností (GOUTELLE et al., 2008).

Hill-Langmuirovu funkci můžeme vyjádřit následujícími způsoby:

$$\theta = \frac{L^n}{K_d + L^n} = \frac{L^n}{[K_A]^{n+L^n}} = \frac{L^n}{1 + \left(\frac{K_A}{[L]}\right)^n}. \quad (3)$$

K_d přitom představuje disociační konstantu, K_A koncentraci ligandů produkující poloviční obsazení, $[L]$ celkovou koncentraci ligandů, θ podíl, ve kterém se proteiny váží na ligandy, a n Hillovu konstantu (LEHNINGER et al., 2013).

V případě, že je Hillova konstanta $n > 1$, výsledná křivka má sigmoidální (esovitý) tvar. Když se však koeficient $n = 1$, křivka bude rostoucí a konkávní na svém definičním oboru (tj. pro všechny nezáporné koncentrace). Taková křivka potom popisuje vztah, kterému se říká rovnice Michaelis-Mentenové (BERNHAEUEROVÁ et al., 2021).

Praktická část

6 HYPOTÉZY

Nejprve bych chtěl uvést svou hypotézu k cílům, které by měly být potvrzeny či vyvráceny jako první.

Prvním stanoveným cílem této práce je porovnání účinku antivirotik fungujících na principu inhibice produkce virových jednotek a inhibitorů virové infekce. Má hypotéza je v tomto případě následující: Lepší účinky (tj. nižší maxima virové nálože, výraznější prodlevy na časové ose) budou vykazovat inhibitory produkce virových jednotek. Při definování této hypotézy vycházím ze studie prováděné v roce 2016 pod vedením Rubena Vardanyana, která zmiňuje, že právě u tohoto typu antivirotik se projevuje vyšší míra klinického používání, zejména pak u inhibitorů proteázy, polymerázy a integrázy. To by dle mého názoru mohlo být způsobeno potenciálně lepšími účinky těchto léčiv.

Druhá hypotéza vztahující se k hlavnímu cíli práce, tj. porovnání vlivu meflochinu a remdesiviru na průběh onemocnění COVID-19, je velmi úzce spojená s první hypotézou: Remdesivir bude při aplikaci na model onemocnění COVID-19 vykazovat lepší účinky, jelikož je zástupcem inhibitorů produkce virových jednotek, které jsou více klinicky používané než inhibitory virové infekce.

7 METODIKA

Z povahy oboru matematického modelování vyplývá častá potřeba použití výpočetního zařízení. Pro tento úkol jsme zvolili z důvodu uživatelské přístupnosti jazyk Python, se kterým jsme pracovali v integrovaném vývojovém prostředí Pycharm od firmy JetBrains.

Výběr dat

Data používaná v praktické části práce byla vybírána podle jejich specifických vlastností.

Základním předpokladem bylo využití Vero buněk, které významně usnadňují tvorbu systému diferenciálních rovnic, které popisují průběh virového onemocnění.

Výběr COVID-19 jako modelového onemocnění je opodstatněno zejména vysokým množstvím dat, které jsou k jeho modelování dostupné. Stejně tak tomu je i u remdesiviru, který byl během pandemie jedním z nejvíce testovaných léčiv.

Řešení a vykreslování základního modelu bez léčiva

Nejdříve bylo nutné programovací jazyk Python použít v praktické části práce při tvorbě grafu základního modelu bez léčiva. K tomuto kroku bylo zapotřebí knihoven „numpy“, „scipy“ a „pyplot“. Tyto knihovny (nebo jejich části = podknihovny) musí být do souboru importovány.

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.integrate import odeint
```

Poté jsme s pomocí funkce „def“ nadefinovali samotný systém diferenciálních rovnic sestavených podle znalostí, které jsou obsaženy v teoretické části práce. S výsledky těchto rovnic můžeme nadále pracovat díky příkazu „return“.

Tento systém vypadá následovně:

```
def virus(x, tt, parameters0):
    s = x[0]
    l = x[1]
    i = x[2]
    v = x[3]

    beta = parameters0[0]
    k_l = parameters0[1]
    k_i = parameters0[2]
    p = parameters0[3]
    c = parameters0[4]

    dx1 = - beta * s * v
    dx2 = beta * s * v - k_l * l
    dx3 = k_l * l - k_i * i
    dx4 = p * i - c * v
```

```
return [dx1, dx2, dx3, dx4]
```

Pro zadání časové škály je použita funkce „linspace“ z knihovny „numpy“. Tato škála je následně společně s počátečními podmínkami a konkrétními parametry použita k řešení systému diferenciálních rovnic. Pro tento proces je možné použít funkci „odeint“ z podknihovny „scipy.integrate“.

```
t = np.linspace(0, 400, 401)
init_condition = [10 ** 5, 0, 0, 1]
parameters = [10 ** (-5), 1 / 24, 1 / 36, 0.2, 1 / 36, 0]
solution = odeint(virus, init_condition, t, args=(parameters,),
mxstep=500)
```

Pro potřeby vykreslování řešení systému diferenciálních rovnic jsou vypočítané hodnoty transponovány a je nadefinován seznam barev.

```
ss = solution.T[0]
ll = solution.T[1]
ii = solution.T[2]
vv = solution.T[3]
colors = ["blue", "pink", "red", "magenta", "black"]
```

Transponované hodnoty jsou následně pomocí funkce „plot“ vykresleny příslušnými barvami. Současně je přidána legenda pomocí funkce „legend“ a popisy os x a y za použití funkce „xlabel“ a „ylabel“. Vykreslení je na závěr vyobrazeno použitím funkce „show“. Všechny funkce zmíněné v tomto odstavci pochází z podknihovny „matplotlib.pyplot“.

```
fig = plt.figure()
plt.rc("font", size=10)
plt.xlabel("Čas")
plt.ylabel("Populace")
plt.plot(t, ss, color=colors[0], linestyle="-", linewidth=1, alpha=1)
plt.plot(t, ll, color=colors[1], linestyle="-", linewidth=1, alpha=1)
plt.plot(t, ii, color=colors[2], linestyle="-", linewidth=1, alpha=1)
plt.plot(t, vv, color=colors[3], linestyle="-", linewidth=1, alpha=1)
plt.legend(["S", "L", "I", "V"])
plt.show()
```

Řešení a vykreslování účinnosti léčiva v závislosti na jeho koncentraci

Stejně jako tomu bylo u řešení základního modelu bez léčiva, tak i zde je nutné nejprve importovat knihovny. Jediným rozdílem je, že není zapotřebí knihovny „scipy“, jelikož se v této části nesetkáváme s žádnou formou diferenciálních rovnic.

Následuje definice funkce léčiva, která je v našem souboru pojmenovaná „meds“. V této funkci se nacházejí 2 různé rovnice – rovnice Michaelis–Mentenové a Hillova rovnice. Volba použití jedné z rovnic je programu signalizována výběrem příslušného typu v následujícím kroku.

```
def meds(parameters, c, type):
    e_max = parameters[0]
    n = parameters[1]
    k = parameters[2]
```

```

if type == "Michaelis_Menten":
    e = (e_max * c) / (c + k)
else:
    e = (e_max * c ** n) / (c ** n + k ** n)

return e

```

Následně je potřeba stanovit příslušné parametry, typ rovnice a koncentraci léčiva. Též je nadefinován seznam barev, které budou použity při vizualizaci grafu. V případě zvolení „Michaelis_Menten“ jakožto typu rovnice je hodnota Hillovy konstanty $n=1$. V zájmu co nejlepšího vykreslení funkce je pro hodnoty koncentrace využita funkce „linspace“ z knihovny „numpy“. Jelikož cílem je sestavit jeden obrázek, který bude obsahovat celkem pět stejných funkcí s odlišným parametrem, je nutné použít funkci „for“, která postupně do rovnice dosadí všechny hodnoty z listu K . Výsledky jsou následně připojeny do dosud prázdného seznamu F .

```

colors = ["blue", "pink", "red", "magenta", "black"]
n = [0.1, 0.5, 1, 2, 5]
C = np.linspace(0, 5, 500)
K = [0.1, 0.5, 1, 2, 5]
F = []
for items0 in K:
    Z = meds([1, 1, items0], C, "Michaelis_menten")
    F.append(Z)

```

Postup řešení Hillovy funkce je v principu podobný. Potýkáme se zde ovšem s tím problémem, že je použito příliš vysoké množství proměnných. Abychom tedy vizualizovali všechny možné variace grafů, musíme jeden z parametrů měnit postupně (v našem případě n).

```

F = []
for items in K:
    Z1 = meds([1, n[0], items], C, "Hill")
    F.append(Z1)

```

Princip vykreslování závislosti účinnosti léčiva na jeho koncentraci podle rovnice Michealis-Mentenové se kromě rozdílných hodnot, legendy (přidána pomocí funkce „legend“) a popisů os (přidány pomocí funkcí „xlabel“ a „ylabel“), liší pouze tím, že je použita funkce „for“. Ta zaručí vykreslení všech pěti variant grafů do jednoho obrázku, přiřazení rozdílných barev ze seznamu „colors“ ke každé z funkcí a vypsání všech použitých hodnot K do legendy. Všechny funkce použité při vykreslování účinnosti léčiva opět pocházejí z podknihovny „matplotlib.pyplot“.

```

fig = plt.figure()
plt.rc("font", size=10)
frame0 = fig.gca()
plt.xlabel("Koncentrace,  $\mu\text{mol}$ ")
plt.ylabel("Účinnost,  $\varepsilon$ ")
for items1 in range(5):
    plt.plot(C, F[items1], color=colors[items1], linestyle="-",
             linewidth=1, alpha=1, label="K = " + str(K[items1]) + "  $\mu\text{mol}$ ")
plt.legend()
fig.tight_layout()
plt.show()

```

Vykreslování Hillovy funkce je kromě přidání nadpisu (vytvořen pomocí funkce „title“ z pod knihovny „matplotlib.pyplot“) identické.

Kombinace účinnosti léčiva se základním modelem bez léčiva

Ke kombinaci modelu léčiva se základním modelem, do kterého léčivo ještě zakomponováno nebylo, je nutné dosadit specifické hodnoty účinnosti a všech parametrů. Tímto krokem se dostaneme k jedné hodnotě efektivity, kterou je možné do soustavy rovnic v příslušných bodech dosadit ve tvaru $(1 - \varepsilon)$.

```
C = np.linspace(0, 5, 501)
K = [0.1, 0.5, 1, 2, 5]
n = [0.1, 0.5, 1, 2, 5]

Z = meds([1, 1, K[1]], C[100], "mm")

def virus(x, tt, parameters):
    s = x[0]
    j = x[1]
    i = x[2]
    v = x[3]

    beta = parameters[0]
    k_l = parameters[1]
    k_i = parameters[2]
    p = parameters[3]
    c = parameters[4]
    X = parameters[5]
    Y = parameters[6]

    dx1 = - beta * (1 - Y) * s * v
    dx2 = beta * (1 - Y) * s * v - k_l * j
    dx3 = k_l * j - k_i * i
    dx4 = p * (1 - X) * i - c * v

    return [dx1, dx2, dx3, dx4]
```

Extrakce dat z grafu popisující účinnost léku při jeho různých koncentracích

K extrakci experimentálních dat, tj. měření inhibičního účinku léčiv na virovou nálož je používán software s názvem „PlotDigitizer“. Do něho je nejdříve potřeba importovat zvolený graf léčiva a následně program na tento graf kalibrovat. Proces kalibrace vyžaduje po uživateli pouze vyznačení počátečních a koncových bodů os a následné označení požadovaných bodů na grafu.

Výsledky jsou následně zkopírovány a připraveny pro jejich další využití.

Dopočítávání reálných parametrů léčiva z dat

Prvním krokem při dopočítávání parametrů je import potřebných knihoven a podknihoven, mezi které se řadí knihovna „numpy“, „scipy“ a podknihovna „matplotlib.pyplot“.

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import scipy
```

Parametry jsou dopočítávány funkcí „optimize.minimize“ z knihovny „scipy“. Tato funkce ovšem pro správnou funkci vyžaduje výchozí parametry a data, metodu výpočtu, a informaci o tom, jaké parametry má optimalizovat.

Do souboru jsou tedy importována výchozí data. Jelikož se jedná o dekadické logaritmy, hodnota 10 je umocněna každým z prvků koncentrace léčiva za využití funkce „for“. Poté následuje zadání počátečních parametrů a další koncentrace, která bude použita až při finálním vykreslování grafu. Pro nadefinování této koncentrace je použita funkce „linspace“ z knihovny „numpy“.

```
concentration = [10 ** c for c in [-1.1125422, -0.810359, -0.5114801,
-0.20897469, 0.0934581, 0.39545515, 0.69767916, 1.0002073]]

data = [0.036116704, 24.440788, 25.299412, 30.036491, 39.205704,
74.96772, 96.87931, 100.23135]

Concentration = [10 ** C for C in np.linspace(-3, 3, 50)]

n = 3
K = 1e-1
N0 = 1e+2
```

Jelikož parametry, které chceme vypočítat pocházejí z Hillovy funkce, musí být nadefinována funkce, která bude právě předpis Hillovy funkce obsahovat. Přidána též musí být rovnice, podle které je jsou tvořeny datové body na samotném grafu. Vracena je hodnota, která na grafu symbolizuje bod na stejné pozici na ose x, jako jsou původní data.

```
def virus(pars, C):
    n = pars[0]
    K = pars[1]
    N0 = pars[2]

    epsilon = 1 / (1 + (K / C) ** n)

    N = N0 * (1 - epsilon)

    return N
```

Pomocí vrácené hodnoty jsou následně v další nadefinované funkci dopočítávány rezidua, ze kterých jsou vytvořeny zmiňované čtverce. Suma čtverců, která je též vrácenou hodnotou, je provedena pomocí funkce „sum“ z knihovny „numpy“.

```
def sum_of_squared_residuals(pars, C, data):
    N = virus(pars, C)
```

```

res = N - data
sumofsqr = np.sum(res ** 2)

return sumofsqr

```

Všechny potřebné informace jsou následně dosazeny do funkce „optimize.minimize“ v příslušném pořadí. Z výsledku jsou vytaženy požadované parametry, které jsou dále dosazeny do funkce „plot“ z knihovny „matplotlib“. Pomocí ní je vytvořen graf obsahující jak počáteční data, která jsou pomocí příkazu „marker“, tak i křivka, na jejíž osu x byla použita koncentrace zadaná pomocí příkazu „linspace“.

```

output = scipy.optimize.minimize(sum_of_squared_residuals,
np.asarray([n, K, N0]), method='Nelder-Mead',
                                args=(concentration, data), )
parsopt = output.x
Nopt = virus(parsopt, Concentration)

plt.figure()
plt.rc("font", size=10)
plt.xlabel("Concentration, log10[$\it{C}$ (μmol)]")
plt.ylabel("Inhibition, (%)")
plt.plot(np.log10(concentration), data, color='black', linestyle=" ",
alpha=1, marker='o', markersize=8)
plt.plot(np.log10(Concentration), Nopt, color='red', linestyle="--",
alpha=1)
plt.tight_layout()
plt.show()

```

Dopočítávání reálných parametrů onemocnění z dat

Proces dopočítávání parametrů onemocnění je ve své podstatě podobný, jako proces dopočítávání parametrů léčiva. Importovanými knihovnami jsou i v tomto případě „numpy“, „matplotlib“ a „scipy“.

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import scipy

```

Následně je definována funkce, která obsahuje systém 4 diferenciálních rovnic popisujících průběh onemocnění. Pomocí funkce „return“ jsou vráceny deriváty obsažené v této rovnici.

```

def virus(x, _, pars):
    s = x[0]
    j = x[1]
    i = x[2]
    v = x[3]
    beta = pars[0]
    k_j = pars[1]
    k_i = pars[2]
    p = pars[3]

    dx1 = - beta * s * v
    dx2 = beta * s * v - k_j * j
    dx3 = k_j * j - k_i * i
    dx4 = p * i
    return [dx1, dx2, dx3, dx4]

```

Následuje definice funkce, jejíž výsledkem je suma reziduí, které vznikají mezi základními datovými body a křivkou, která se řídí podle systému diferenciálních rovnic a popisuje stav virové nálože. Nejprve jsou odlogaritmovány (v této době neznámé) parametry. Pomocí funkce „odeint“ z podknihovny „scipy.integrate“ je řešena funkce „Virus“, která byla definována v minulém kroku. Poté jsou z křivky popisující změny ve virové náloži vybrány pouze body, které jsou ve stejném časovém bodě, jako původní data. Tyto hodnoty jsou od původních dat odečteny, čímž se vytvoří rezidua, která jsou následně umocněna a sečtena.

```
def sum_of_squared_residuals(pars):
    pars = 10 ** pars

    output = scipy.integrate.odeint(virus, init_condition, tt,
    args=(pars, eps, ), mxstep=500)
    V = np.log10((output.T[3])[get_time_id])

    res = V - data
    sumofsqr = np.sum(res ** 2)

    return sumofsqr
```

Iterativně jsou hledány shody mezi prvky v množině vytvořené pomocí funkce „linspace“ a původními časovými body. Jsou též zadány souřadnice původních bodů, počáteční podmínky a parametry, které se během procesu optimalizace mění. Jelikož jsou všechny údaje uvedeny v podobě dekadického logaritmu, i samotné parametry jsou logaritmovány.

```
data = np.log10([169000, 385000, 428000, 526667])
init_condition = [10 ** 5, 0, 0, 10 ** 4]
tt_points = [24, 48, 72, 96]
tt = np.linspace(0, 96, 961)
get_time_id = []
for data_time_item in tt_points:
    for t_id, t in enumerate(tt):
        if t == data_time_item:
            get_time_id.append(t_id)
init_parameters = [10 ** (-5), 1 / 48, 1 / 24, 0.3]
pars = np.log10([init_parameters])
```

Pomocí funkce „minimize“ z podknihovny „scipy.optimize“ jsou zjištěny parametry. Používanou metodou při těchto výpočtech je metoda Nelder-Mead. Výsledné parametry jsou následně pomocí funkce „print“ vypsány ve formě dekadických logaritmů.

```
output = scipy.optimize.minimize(sum_of_squared_residuals,
np.asarray(pars), method='Nelder-Mead',)

print('log10 beta = %.4f' % output.x[0])
print('log10 k_j = %.4f' % output.x[1])
print('log10 k_i = %.4f' % output.x[2])
print('log10 p = %.4f' % output.x[3])
```


8 TVORBA MATEMATICKÝCH ROVNIC

Touto kapitolou zaměřující se na tvorbu matematických rovnic začíná první fáze matematického modelování – formulace.

8.1 Základní matematický model onemocnění

Při tvorbě základního matematického modelu infekce uvažujeme tři stavy, ve kterých se buňky mohou nacházet, tj. zdravé buňky S , latentní buňky L a infekční buňky I . Druhou významnou nebuněčnou složkou jsou viry V .

Zdravé buňky a viry jsou nezbytnou součástí matematického modelu, jelikož právě tyto dvě složky jsou základem virového onemocnění (viz kapitola 1). Důvodem adice infekčního stavu buňky I je fakt, že právě tyto buňky produkují nové virové jednotky V . Produkce infekčních virových jednotek V ovšem nastává až po určité časové prodlevě. Proto je do modelu přidána latentní fáze buňky L .

Cílem je tedy sestavení systému čtyř diferenciálních rovnic, z nichž každá bude popisovat časovou změnu stavu jedné ze zmíněných složek.

Tabulka 1 – Výpis všech používaných parametrů v praktické části práce a jejich jednotek

Parametr	Význam	Jednotka
β	rychlost infekce	virus ⁻¹ · h ⁻¹
k_L	rychlost přeměny latentních buněk na infekční buňky	h ⁻¹
k_I	rychlost zániku infekčních buněk	h ⁻¹
p	rychlost produkce virových jednotek infekčními buňkami	virus·buňka ⁻¹ · h ⁻¹
c	rychlost zániku virových jednotek	h ⁻¹
ε_I	účinnost inhibitoru virové infekce	-
ε_p	účinnost inhibitoru produkce virových jednotek	-
ε_{max}	maximální účinnost	-
C	koncentrace léčiva	μmol
K	half-saturation constant	μmol

n	Hillova konstanta	-
-----	-------------------	---

Proměnná	Význam	Jednotky
S	zdravé buňky	Buňka · ml ⁻¹
L	latentní buňky	Buňka · ml ⁻¹
I	infekční buňky	Buňka · ml ⁻¹
V	virové jednotky	RNA · ml ⁻¹

Mezi konstanty v rovnici ovlivňující množství zdravých buněk S v závislosti na čase t řadíme pouze rychlost infekce β . Tento parametr svojí hodnotou ovlivňuje rychlost úbytku zdravých buněk S . Současně je nutno podotknout, že není počítáno s příbytkem zdravých buněk S se stálou rychlostí. Důvodem je inhibice reprodukčního cyklu buňky virem, který si tímto krokem zajišťuje lepší podmínky pro vlastní reprodukci (viz kapitola 1.2.1) Množství zdravých buněk S je ohraničeno, jelikož zde uvažujeme virovou infekci in vitro (viz kapitola 3). Časová změna koncentrace zdravých buněk S se řídí rovnicí:

$$\frac{dS}{dt} = -\beta \cdot S \cdot V.$$

Infikované zdravé buňky se stávají latentními L podle rovnice. Důvodem je, že rychlost, s jakou zdravé buňky opouštějí stav S , je roven rychlosti, s jakou latentní buňky vstupují do stavu L . Tato rovnice má tvar

$$\frac{dL}{dt} = \beta \cdot S \cdot V - k_L \cdot L,$$

přičemž parametr k_L vyjadřuje rychlost přeměny latentních buněk L na infekční buňky I .

Rovnice popisující počet infekčních buněk I v závislosti na čase t nadále pracuje s hodnotami popisujícími množství přeměněných latentních buněk L na buňky infekční I . V této situaci počítáme ovšem i zanikáním infekčních buněk I s rychlostí, kterou označujeme k_I . Rovnice popisující časovou změnu v koncentraci infekčních buněk má tvar:

$$\frac{dI}{dt} = k_L \cdot L - k_I \cdot I.$$

Poslední sledovanou složkou jsou virové jednotky V , jejichž množství je závislé na rychlosti produkce virových jednotek p infekčními buňkami I . Kvantita virových jednotek je také ovlivňována rychlostí c , se kterou tyto částice zanikají. Důležité je též podotknout, že data používaná v nadcházejících částech práce (viz kapitola 11) byla získána za experimentální infekce Vero buněk virem SARS-CoV-2. Neschopnost těchto buněk produkovat interferony je důvodem, proč do modelu není zakomponován vliv imunitního systému. Rovnice popisující časovou změnu v koncentraci infekčního viru má tvar:

$$\frac{dV}{dt} = p \cdot I - c \cdot I.$$

Finální verze základního modelu virového onemocnění tedy bude vypadat následovně:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -\beta \cdot S \cdot V \\ \frac{dL}{dt} &= \beta \cdot S \cdot V - k_L \cdot L \\ \frac{dI}{dt} &= k_L \cdot L - k_I \cdot I \\ \frac{dV}{dt} &= p \cdot I - c \cdot V \end{aligned} \tag{4}$$

8.2 Rozšířený matematický model onemocnění

Pro zkonstruování matematického modelu účinku léčiva na průběh virové infekce je v první řadě nutno specifikovat typ léčiva, které bude v boji proti virovému onemocnění používáno. V našem případě se bude jednat o kombinaci léčiv, z nich se jedno bude zaměřovat na inhibici produkce virových částic infikovanými buňkami a druhé na inhibici virové infekce zdravých buněk infekčním virem. Specifické funkce léčiva jsou popsány v teoretické části (viz kapitola 2).

Inhibitor virové infekce ε_i se projevuje v rovnici popisující množství zdravých buněk S v závislosti na čase t , a to snižováním rychlosti s jakou virové jednotky infikují zdravé buňky $\beta \cdot V$. Objevuje se ovšem i v rovnici popisující množství latentních buněk L v závislosti na čase t (viz kapitola 1.1).

Mezi typy inhibitorů spadající do této kategorie se řadí pouze inhibitory přichycení a průniku, jelikož právě tyto typy zabraňují samotné infekci buňky.

Tento princip je popsán v následujících rovnicích takto:

$$\begin{aligned}
\text{I.} \quad \frac{dS}{dt} &= -\beta \cdot (1 - \varepsilon_i) \cdot S \cdot V \\
\text{II.} \quad \frac{dL}{dt} &= (1 - \varepsilon_i) \cdot \beta \cdot S \cdot V - k_L \cdot L
\end{aligned}
\tag{5}$$

Inhibitor produkce virových jednotek e_p , který je závislý na množství podaného léčiva C , se bude v diferenciální rovnici popisující množství virových jednotek v závislosti na čase t projevovat snížením rychlosti produkce virových jednotek V infekčními buňkami I . Tento zásah do matematického modelu bude mít přímý a negativní dopad na množství vyprodukovaných virových jednotek V . Tento efekt je popsán v rovnici pro virus takto:

$$\frac{dV}{dt} = (1 - \varepsilon_p) \cdot p \cdot I - c \cdot V
\tag{6}$$

Mezi inhibitory produkce virových se řadí všechny typy inhibitorů kromě inhibitorů přichycení a průniku, které jsou příklady inhibitorů virové infekce.

V obou případech inhibice se hodnota inhibitorů e_i a e_p bude pohybovat v intervalu $(0;1)$, přičemž v hodnotě 0 se léčivo stává neefektivním a v opačném případě dochází ke kompletní inhibici virové infekce nebo inhibici vzniku virových jednotek, a tudíž k i postupné eradikaci daného virového onemocnění.

Konečný model, ve kterém jsou zahrnuté oba typy inhibitorů, bude tedy vypadat následovně:

$$\begin{aligned}
\frac{dS}{dt} &= -\beta \cdot (1 - \varepsilon_i) \cdot S \cdot V \\
\frac{dL}{dt} &= (1 - \varepsilon_i) \cdot \beta \cdot S \cdot V - k_L \cdot L \\
\frac{dI}{dt} &= k_L \cdot L - k_I \cdot I \\
\frac{dV}{dt} &= (1 - \varepsilon_p) \cdot p \cdot I - c \cdot V
\end{aligned}$$

8.3 Odvození reprodukčního čísla

Reprodukční číslo R_0 viru je hodnota, která nám udává počet nově vyprodukovaných virových částic nebo nově infikovaných buněk, které vzniknou z primární infekce způsobené jednou virovou částicí nebo infikovanou buňkou v populaci zcela zdravých buněk. Na začátku infekce máme počáteční podmínky, kdy koncentrace zdravých buněk je $S(0) = S_0$, latentních buněk je $L(0) = 0$, infekčních buněk je $I(0) = 0$ a viru je $V(0) = V_0 > 0$.

Nejprve odvodíme R_0 pro infekci bez efektu léčiv. Budeme předpokládat, že virus pronikne do zdravých buněk velice rychle, prakticky ihned po kontaktu. Tudiž část zdravých buněk se ihned stane buňkami latentními. Na počátku infekce je dynamika viru i latentních buněk rychlá, a můžeme udělat zjednodušující předpoklad, že $\frac{dV}{dt} = 0$ a $\frac{dL}{dt} = 0$. Proto můžeme vyjádřit ze čtvrté rovnice proměnnou V ,

$$p \cdot I - c \cdot V = 0 \Rightarrow V = \frac{p \cdot I}{c}$$

dosadit ji do druhé rovnice a z druhé rovnice vyjádřit proměnnou L .

$$\beta \cdot S_0 \cdot V - k_L \cdot L = 0 \Rightarrow L = \frac{\beta \cdot S_0 \cdot \frac{p \cdot I}{c}}{k_L}.$$

Takto vyjádřenou proměnnou L dosadíme do rovnice pro změnu koncentrace infekčních buněk I :

$$\frac{dI}{dt} = k_L \cdot \frac{\beta \cdot S_0 \cdot \frac{p \cdot I}{c}}{k_L} - k_I \cdot I.$$

Aby se infekce mohla šířit buňkami, je nutné, aby se koncentrace infekčních buněk zvětšovala, tj. aby $\frac{dI}{dt} > 0$. Předchozí rovnici můžeme upravit:

$$\begin{aligned} \frac{dI}{dt} &= \left(\frac{k_L \cdot \beta \cdot S_0 \cdot p}{c \cdot k_L} - k_I \right) \cdot I \\ \frac{dI}{dt} &= \left(\frac{\beta \cdot S_0 \cdot p}{c} - k_I \right) \cdot I \end{aligned}$$

Ihned vidíme, že aby $\frac{dI}{dt} > 0$, tak $\frac{\beta \cdot S_0 \cdot p}{c} - k_I > 0$, což vede na podmínku $\frac{\beta \cdot S_0 \cdot p}{k_I \cdot c} > 1$. Výrazu na levé straně říkáme základní reprodukční číslo R_0 a

$$R_0 = \frac{\beta \cdot S_0 \cdot p}{k_I \cdot c}.$$

Podobně postupujeme v případě pro odvození reprodukčního čísla z rovnic, které obsahují dodatečný efekt about léčiv. Tudiž

$$\text{I.} \quad 0 = (1 - \varepsilon_I) \cdot \beta \cdot S_0 \cdot V - k_L \cdot L$$

$$L = \frac{(1 - \varepsilon_I) \cdot \beta \cdot S_0 \cdot V}{k_L}$$

$$\text{II.} \quad 0 = (1 - \varepsilon_p) \cdot p \cdot I - c \cdot V$$

$$V = \frac{(1 - \varepsilon_p) \cdot p \cdot I}{c}$$

$$\text{III.} \quad 0 < k_L \cdot L - k_I \cdot I$$

$$0 < k_L \cdot \frac{(1 - \varepsilon_I) \cdot \beta \cdot S_0 \cdot V}{k_L} - k_I \cdot I$$

$$0 = k_L \cdot \frac{(1 - \varepsilon_I) \cdot \beta \cdot S_0 \cdot V}{k_L} - k_I \cdot I$$

$$0 < k_L \cdot \frac{(1 - \varepsilon_I) \cdot \beta \cdot S_0 \cdot \frac{(1 - \varepsilon_p) \cdot p \cdot I}{c}}{k_L} - k_I \cdot I$$

$$0 < (1 - \varepsilon_I) \cdot \beta \cdot S_0 \cdot \frac{(1 - \varepsilon_p) \cdot p \cdot I}{c} - k_I \cdot I$$

$$0 < \left((1 - \varepsilon_I) \cdot \beta \cdot S_0 \cdot \frac{(1 - \varepsilon_p) \cdot p}{c} - k_I \right) \cdot I$$

\Leftrightarrow

$$0 < (1 - \varepsilon_I) \cdot \beta \cdot S_0 \cdot \frac{(1 - \varepsilon_p) \cdot p}{c} - k_I$$

\Leftrightarrow

$$1 < (1 - \varepsilon_I) \cdot \beta \cdot S_0 \cdot \frac{(1 - \varepsilon_p) \cdot p}{k_I \cdot c}$$

Vidíme tedy, že

$$R_0 = (1 - \varepsilon_I) \cdot \beta \cdot S_0 \cdot \frac{(1 - \varepsilon_p) \cdot p}{k_I \cdot c}. \quad (7)$$

Jakmile je reprodukční číslo $R_0 > 1$, znamená to, že každá primárně infikovaná buňka vyprodukuje alespoň jednu infikovanou buňku. Infekce se tedy šíří v populaci buněk. Když je na druhou stranu reprodukční číslo $R_0 < 1$, nastává situace opačná a infekce se nešíří.

8.4 Matematický model účinnosti léčiv

Pro účinnost léčiva platí, že je vždy závislá na množství léčiva C , které se rozhodneme při léčbě aplikovat. Samotné léčivo je ovšem také charakterizováno různými vlastnostmi, které se následně odráží na jeho efektivitě. Mezi ně se řadí i tzv. „half-saturation constant“ K , která je definována jako množství léku, které je potřeba k dosažení poloviny jeho maximální účinnosti. Za maximální účinnost je považována hodnota 100 %. Účinnost se tedy musí pohybovat v intervalu $(0;1)$. Maximální hodnoty ovšem reálná hodnota účinnosti většinou nedosahuje. Lék tedy nikdy nebudeme považovat za 100 % účinný a skutečným intervalem je tedy $(0;1)$. Vztah mezi koncentrací léčiva a účinností léčiva je popsán ve dvou rovnicích, které budeme používat při určování účinnosti léčiva.

8.4.1 Matematický model vztahu Michaelis-Mentenové

První z nich je vztah Michaelis-Mentenové s předpisem:

$$\varepsilon(C) = \varepsilon_{max} \cdot \frac{C}{K + C}. \quad (8)$$

Mezi parametry zde patří maximální efektivita léčiva ε_{max} , která je potřebná zejména k definování intervalu, ve kterém se finální účinnost bude pohybovat. Ve zlomku se též vyskytuje jediná konstanta specifická pro určité léčivo, kterou je již zmiňovaná half-saturation constant K , společně s příslušnou dávkou léčiva C .

8.4.2 Matematický model Hillovy rovnice

Druhý vztah vyplývá z Hill-Langmuirovy rovnice (3), kde je pouze nutná substituce původních parametrů za ty, které jsou pro určení efektivity léčiva při různých koncentracích relevantní.

Jelikož léčivo je samo o sobě ligandem, původní celkovou koncentraci ligandů $[L]$ můžeme nahradit koncentrací léčiva C . Ze stejného důvodu můžeme nahradit koncentraci ligandů produkující poloviční obsazení K_A za half-saturation-constant K . Poslední změnou je nahrazení původního podílu, ve kterém se proteiny vážou na ligandy θ , za efektivitu léčiva ε . Proteiny pak v naší situaci symbolizují samotné viry, jelikož právě proteiny jsou jejich hlavní složkou (viz kapitola 1). K definování intervalu, ve kterém se finální účinnost bude pohybovat, je do modelu ještě přidán parametr ε_{max} . Hillův koeficient n , který v porovnání se vztahem Michaelis-Mentenové přebývá, je z Hill-Langmuirovy rovnice zachován.

Hilova rovnice má ve finální verzi tvar:

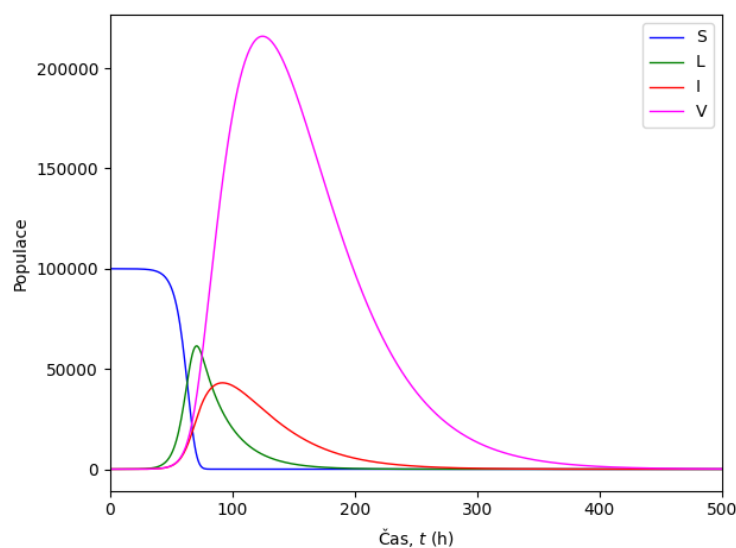
$$\varepsilon(C) = \varepsilon_{max} \cdot \frac{C^n}{K^n + C^n}. \quad (9)$$

9 MODELOVÁNÍ

9.1 Modelování základního matematického modelu onemocnění

K vytvoření modelu průběhu virového onemocnění je použita soustava rovnic (4), která se zaměřuje na čtyři základní složky, jimiž jsou zdravé buňky S , latentní buňky L , infekční buňky I a virové jednotky V .

Mezi výchozí podmínky modelu se řadí 1 virová jednotka V a 10^5 zdravých buněk S . Parametry byly zvoleny takovým způsobem, aby byly na modelu zřetelně viditelné



Graf 2 – Průběh základního modelu onemocnění za použití pouze ilustračních parametrů

mechanismy, podle kterých se model chová: $\beta = 10^{-5} h^{-1}$; $k_L = 1/24 h^{-1}$; $k_I = 1/36 h^{-1}$; $p = 1/5 \frac{\text{virus}}{\text{buňka} \cdot h}$; $c = 1/36 h^{-1}$

Z grafu lze vidět, že počet vyprodukovaných virionových částic výrazně převyšuje počet zdravých buněk, které má virus po dobu simulace k dispozici. Též je patrné, že množství virionových částic dosáhne vrcholu okolo 90. hodiny, po které už začíná jejich množství výrazně klesat. Důvodem je nenulový parametr c , který zapříčiňuje pokles virových jednotek stálou rychlostí.

Z grafu je dále patrné, že pokles virových jednotek následuje jen několik hodin po poklesu infekčních buněk. Jejich pokles je způsoben poklesem v populaci buněk latentních, jejichž pokles je závislý na vyčerpání zásob zdravých buněk. Vyobrazené kvantify, kterých v simulaci populace buněk a virových částic dosáhnou, nejsou relevantní, jelikož se jedná pouze o ilustrační model.

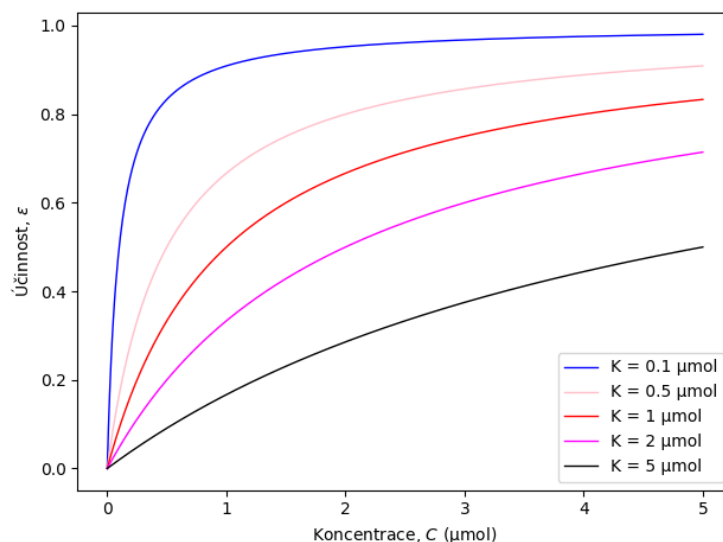
9.2 Modelování účinnosti léčiva v závislosti na jeho koncentraci

Jak bylo zmíněno v kapitole popisující rozšířený model onemocnění (viz kapitola 6.2), v simulacích budou popisovány dva druhy účinků léčiv. Prvními jsou inhibitory produkce virových jednotek, které, jak už je z názvu patrné, snižují rychlost produkce virových jednotek infekčními buňkami. Inhibitory virové infekce na druhou stranu snižují rychlost, s jakou virus infikuje zdravé buňky, což má za důsledek pomalejší přeměnu zdravých buněk na buňky latentní. Účinnost léčiva v závislosti na množství podaného léčiva je definována rovnicemi (8, 9).

Pro simulaci budou užívány měnící se parametry K a n . Zatímco parametr n je číslo, parametr K je určité množství léčiva. Z toho důvodu je stejně jako koncentrace léčiva vyjadřován v mikromolech, μmol . Parametr ε_{\max} zůstane pro všechny simulace jednotný kvůli jeho následnému použití v rozšířených diferenciálních rovnicích popisujících průběh virového onemocnění.

9.2.1 Modelování vztahu Michaelis-Mentenové

V první řadě bude vykreslen model vycházející z prvního systému rovnic (8), u kterého se ovšem bude měnit parametr K . Koncentrace léčiva na výkresu se pohybuje v intervalu 0-5 μmol . Hodnoty zvolené pro parametr K nebudou přesahovat hodnotu 5 μmol , aby bylo zřejmé, že při koncentraci léčiva C odpovídající parametru K je účinnost ε opravdu rovná 50 %.



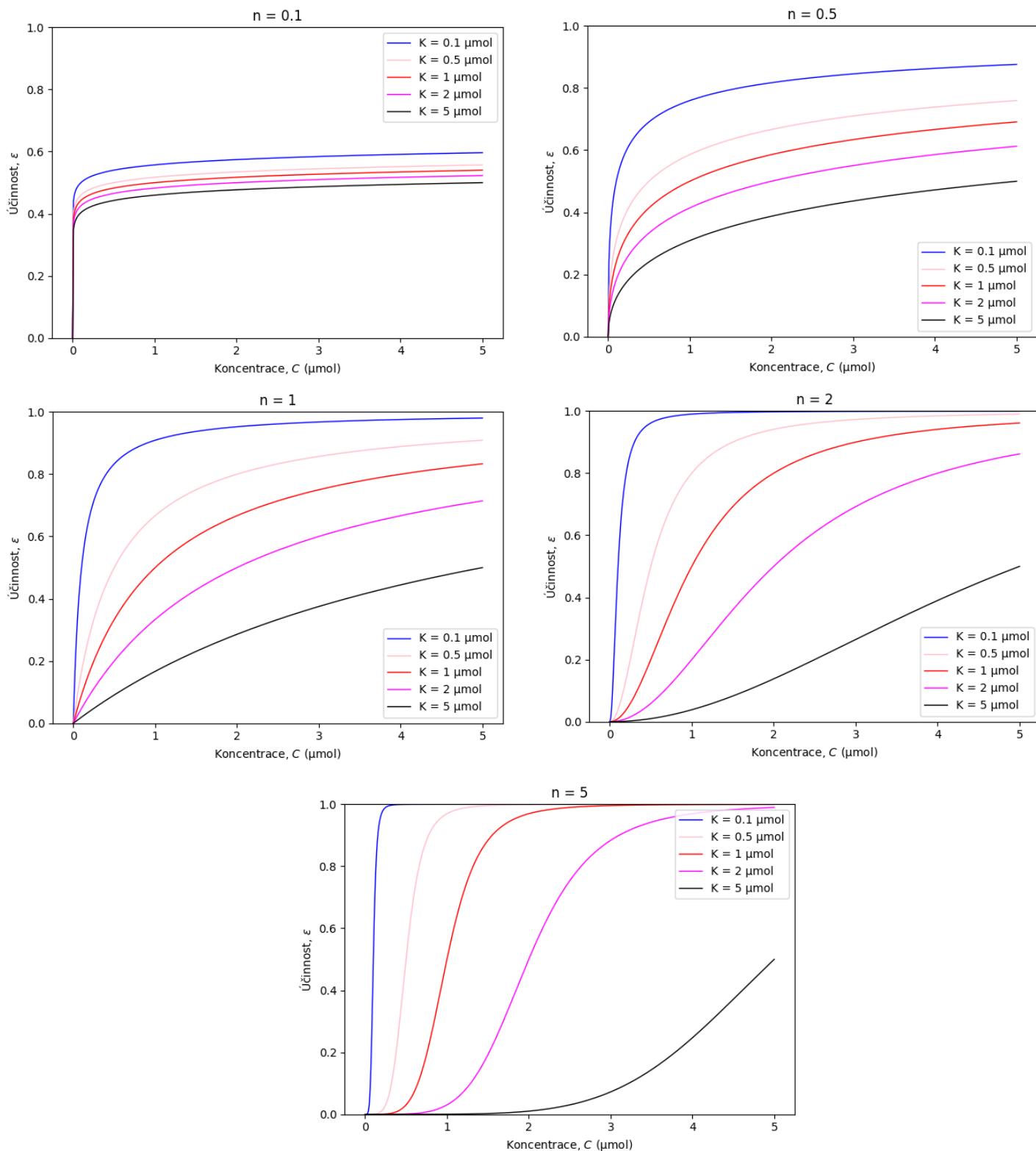
Graf 3 – Závislost účinnosti léčiva fungujícího na bázi vztahu Michaelis-Mentenové na hodnotě parametru half-saturation constant K a koncentraci léčiva C

Na grafu je patrné, že s rostoucím parametrem K se také musí zvyšovat koncentrace léčiva, aby léčivo zůstalo dostatečně efektivní. V zájmu co nejúčinnější léčby je tedy žádoucí, aby byl parametr K co možná nejmenší. Při vyšších hodnotách tohoto parametru je totiž nutné podávat větší množství léku pro dosažení stanoveného cíle, kterým je v našem případě co možná největší inhibice viru. Příliš vysoké dávky léčiv ale často bývají pro lidské tělo toxické či jinak škodlivé a jejich podávání ve větším množství je pak nežádoucí (viz kapitola 2).

Úplnou efektivitu na grafu 3 na ose y vyznačuje hodnota 1. Do této hodnoty se ovšem reálná efektivita léčiva nikdy nedostane. Důvodem je parametr K ve jmenovateli, který je nenulovým číslem. Celý zlomek $\frac{C}{K+C}$ bude tedy vždy menší než 1.

9.2.2 Modelování Hillovy rovnice

V druhé rovnici (9) se již vyskytují dva parametry. Pro účely utvoření představy o tom, jak se tato funkce chová při různých hodnotách parametrů, bude vykreslen model obsahující škálu různých hodnot pro oba parametry. Pro parametr K budou stanoveny stejné hodnoty, se kterými bylo pracováno v předchozí simulaci vycházející z prvního systému rovnic (8). Parametr n byl zvolen takovým způsobem, aby byl vidět mechanismus funkce daného typu léku při odlišných hodnotách parametru. Jelikož se ovšem vybrané hodnoty nijak nevztahují k reálné funkci léčiv, následující vizualizace lze považovat pouze za ilustrační.



Graf 4 – Závislost účinnosti léčiva fungujícího na bázi Hillovy rovnice na hodnotě Hillovy konstanty n , half-saturation constant K a koncentrace léčiva C

Na grafech je patrné, že vysoká účinnost léku se dostavuje při vyšších hodnotách parametru K až s větší dávkou podávaného léku. Stejná situace nastávala u modelu léku, jehož mechanismus vycházel ze vztahu Michaelis-Mentenové.

Parametr n způsobuje zakřivení funkce do tzv. „esovitého“ tvaru. Kvůli tomu nedochází k největšímu růstu efektivity hned na začátku, jako tomu bylo u modelu léku vycházejícího z prvního systému rovnic (8). K nejvyššímu růstu dochází před místem, kdy se koncentrace léčiva rovná hodnotě „half-saturation constant“. Před tímto okamžikem i po něm již efektivita roste pomaleji. Z tohoto důvodu má tento parametr nejmenší dopad na případ s nejnižším parametrem K .

Je též zřetelné, že jakmile se parametr $n = 1$, model se stává totožným s modelem vycházejícím ze vztahu Michaelis-Mentenové.

9.3 Rozšířený model onemocnění

Účelem tvorby rozšířených modelů onemocnění je přiblížení dopadů změny dávek léků na průběh virového onemocnění. Tyto léky mohou mít různé hodnoty parametrů, které ovlivňují jejich účinnost při inhibici virového onemocnění. Pro zvýšení přehlednosti budou zároveň všechny složky, mezi které patří zdravé buňky S , latentní buňky L , infekční buňky I a virové částice V , rozděleny do příslušných grafů obsahující vždy jen jednu ze zmíněných složek.

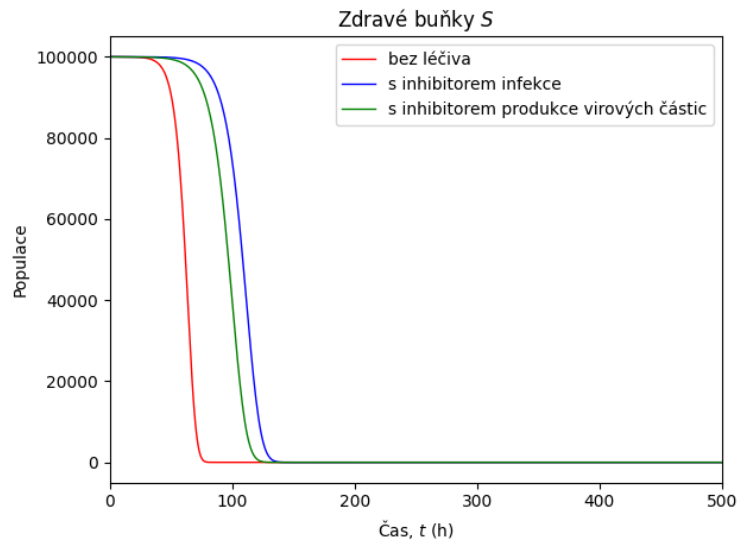
9.3.1 Porovnání základního modelu onemocnění s modely rozšířenými o inhibitor virové infekce a inhibitor produkce virových jednotek

Inhibitor virové infekce je aplikován na první a druhou diferenciální rovnici ze systému onemocnění (viz rovnice 5), kde zároveň snižuje rychlost úbytku zdravých buněk a rychlost příbytku buněk latentních.

Inhibitor produkce virových jednotek představuje druhý způsob, jakým můžeme zakomponovat léčivo do základního modelu virového onemocnění. Objevuje se ve čtvrté rovnici, která sleduje množství virových jednotek v závislosti na čase (viz rovnice 6).

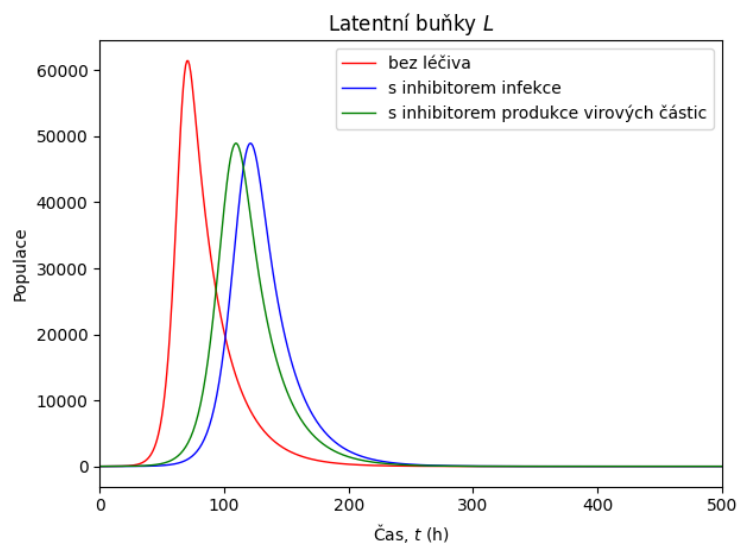
K zachování možnosti porovnání rozšířených modelů onemocnění (viz rovnice 5, 6) s modelem základním (viz rovnice 4) budou při tvorbě grafu zachovány stejné počáteční podmínky a parametry, které byly použity při tvorbě modelu základního (viz kapitola 9.1)

Léčiva používaná v modelech budou vždy dosahovat účinnosti 70 %.



Graf 6 – Vyobrazení vlivů inhibitoru virové infekce a inhibitoru produkce virových jednotek na populaci zdravých buněk S a jejich porovnání s vývojem populace zdravých buněk S v základním modelu onemocnění (bez léčiva)

Při porovnávání je zřejmé, že zdravé buňky ve všech modelech jsou postupně přeměňovány na buňky latentní. Modely s léčivem se do bodu přeměny všech buněk ovšem dostávají s výraznou prodlevou. Tato prodleva je nejvýraznější u buněk, na které byl aplikován inhibitor virové infekce.



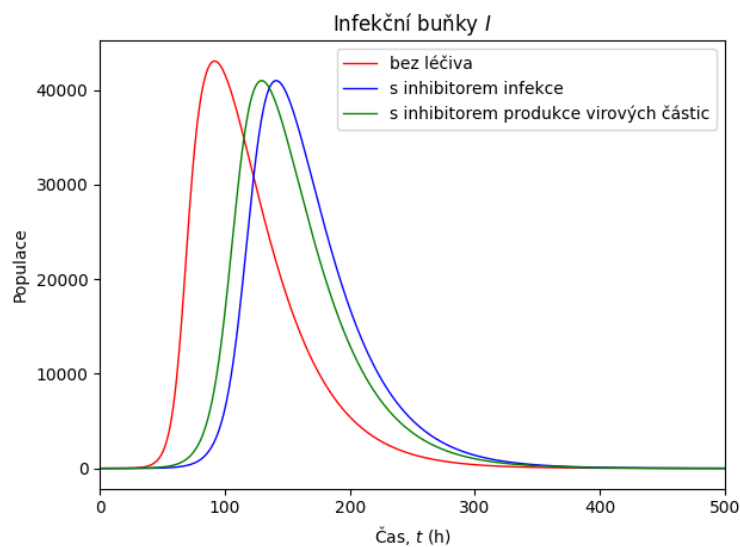
Graf 5 – Vyobrazení vlivů inhibitoru virové infekce a inhibitoru produkce virových jednotek na populaci latentních buněk L a jejich porovnání s vývojem populace latentních buněk L v základním modelu onemocnění (bez léčiva)

Na grafu, jehož účelem je porovnání vývoje populace latentních buněk modelu bez léčiva s modelem, ve kterém byla aplikována léčiva, můžeme pozorovat řadu změn.

Zánik populace latentních buněk v modelech s léčivem je vůči modelu bez léčiva výrazně časově posunutý. Největšího posunu je opět dosaženo u modelu s inhibítozem virové infekce.

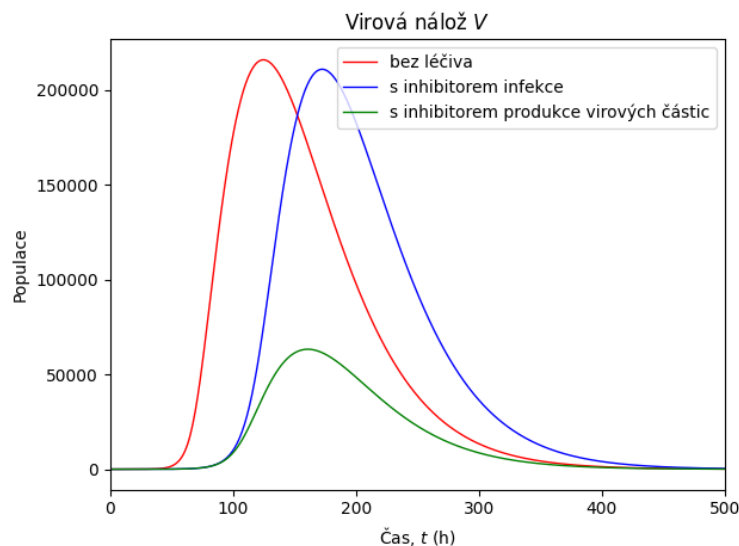
Maximum, kterého dosáhla populace latentních buněk, ve které nebylo použito ani jedno z léčiv, je zřetelně vyšší než to u populací latentních buněk, kde léčiva použita byla. Maxima u modelů s inhibitory jsou kvantitativně stejná.

Celkové množství buněk, které je po dobu experimentu přeměněno v latentní, je ovšem stejné, jelikož na grafu minulém můžeme pozorovat přeměnu všech zdravých buněk v buňky latentní.



Graf 7 – Vyobrazení vlivů inhibitorů virové infekce a inhibitorů produkce virových jednotek na populaci infekčních buněk I a jejich porovnání s vývojem populace infekčních buněk I v základním modelu onemocnění (bez léčiva)

U porovnání modelů populací infekčních buněk je vidět podobný trend jako v minulém grafu. Rozdílem jsou odlišnosti v časovém posunu, které jsou oproti minulému grafu méně výrazné. Populace infekčních buněk ve všech modelech pak postupně umírá.



Graf 8 – Vyobrazení vlivů inhibitoru virové infekce a inhibitoru produkce virových jednotek na virovou nálož V a jejich porovnání s vývojem populace virové nálož v základním modelu onemocnění (bez léčiva)

Poslední sledovanou složkou je virová nálož. Nejvíce výraznou změnou oproti předchozím grafům je výrazný pokles maxima, který můžeme pozorovat u modelu, ve kterém byl aplikován inhibitor produkce virových jednotek. Maximum populace přichází nejpozději v modelu s inhibítoem virové infekce a nejdříve v modelu bez aplikovaného léčiva. Celá virová populace postupně vymírá, ačkoliv tento proces je časové posunut u modelu s léčivem v porovnání s modelem bez léčiva.

10 ODHADOVÁNÍ REÁLNÝCH PARAMETRŮ LÉČIV

Odhadování reálných parametrů léčiv je nutné pro dosažení druhého z cílů práce, kterým je zjišťování účinnosti léčiva při jeho libovolné koncentraci. Tyto parametry mohou dále být použity pro vytvoření křivky popisující účinnost léčiva v závislosti na jeho koncentraci. Reálné parametry léčiv jsou ovšem také důležité ke splnění hlavního z cílů práce, kterým je porovnávání účinnosti dvou základních kategorií antivirotik.

Jelikož předpisem pro tuto křivku bude právě Hillova funkce, mezi požadované parametry patří half-saturation constant K a Hillova konstanta n . Jelikož je za maximální účinnost považována hodnota 100 %, hodnota tohoto parametru v rovnicích bude vždy 1.

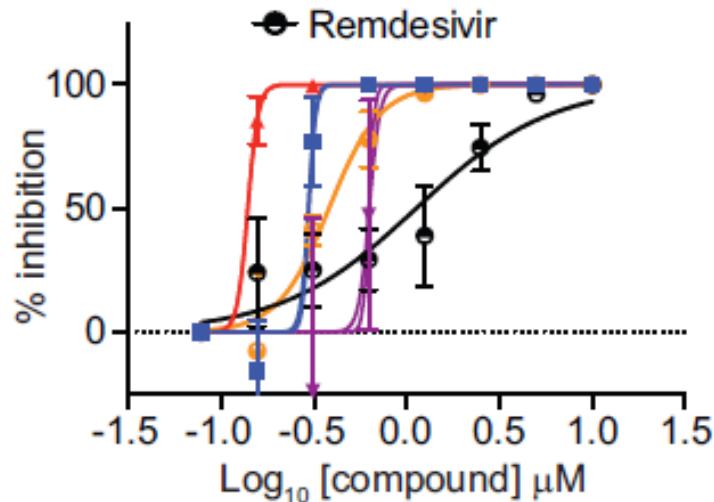
10.1 Odhadování reálných parametrů inhibitorů produkce virových jednotek

Zvoleným zástupcem kategorie inhibitorů virové replikace je léčivo s názvem remdesivir.

Remdesivir je lék fungující na principu inhibice polymerázy a je často používán při léčbě pacientů s onemocněním COVID-19. Obsáhleji je toto léčivo rozebíráno v teoretické části (viz kapitola 2.1.1).

10.1.1 Extrakce dat z grafu popisujícího účinnost remdesiviru při jeho různých koncentracích

Při extrakci dat z grafů je nutné přizpůsobit práci typu grafu, který máme k dispozici.



Obrázek 2 – Závislost inhibice virových jednotek na použité koncentraci remdesiviru (zdroj datových bodů) – (SCHOOLEY et al., 2021)

V našem případě se jedná o graf, na jehož ose x jsou vypsány dekadické logaritmy použitých hodnot koncentrací, které jsou uvedeny v jednotkách μmol . Osa y pak znázorňuje efektivitu daného léčiva, která je vypočítána pomocí vzorce $\varepsilon = \frac{V_x}{V_0}$, kde V_x vyjadřuje úbytek ve virové náloži a V_0 virovou nálož před použitím léčiva. Samotná účinnost je pak vyjádřena v procentech.

Samotná extrakce dat je pak prováděna pomocí specializovaného programu, jehož přesnější použití je popsáno v kapitole metodiky „Extrakce dat z grafu popisující účinnost léku při jeho různých koncentracích“.

10.1.2 Dopočítávání reálných parametrů remdesiviru z dat

Pro zjednodušení práce s daty jsou tato data v první řadě odlogaritmována. Tento proces je proveden pouze u koncentrací, jelikož samotná efektivita uváděna v logaritmech není.

Odlogaritmovaná data jsou následně optimalizována pomocí specializované funkce přístupné v programu Python. Tato funkce funguje na základě metody nejmenších čtverců (viz kapitola 5.2). Rovnice pro součet čtverců je odvozena ze základní rovnice (2), přičemž data, na která budeme následně Hillovu rovnici fitovat mají souřadnice $[C_i; \varepsilon_i]$ a body na stejné pozici na ose x, které náleží předpisu Hillovy funkce mají souřadnice $[C_i; \frac{C_i^n}{K^n + C_i^n}]$. Suma nejmenších čtverců s dosazenými hodnotami má pak tvar:

$$T = \sum_{i=1}^N \left(\varepsilon_i - \frac{C_i^n}{K^n + C_i^n} \right)^2. \quad (10)$$

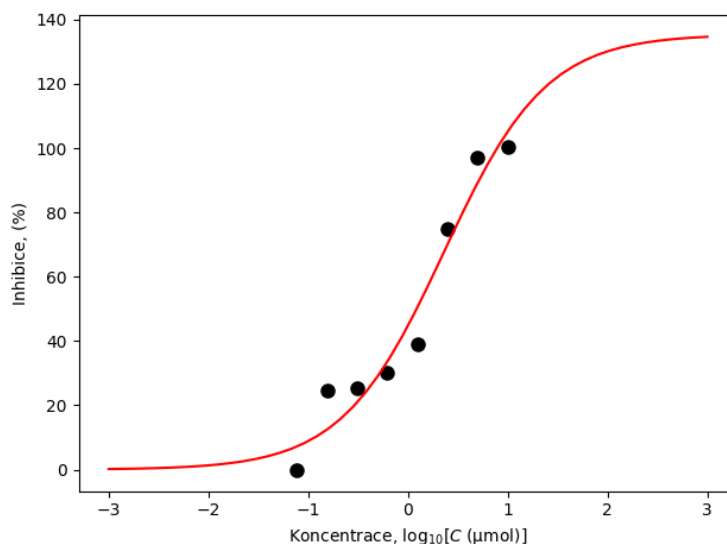
Důvodem pouze Hillovy rovnice, a ne na vztah Michaelis-Mentenové, na data je jejich shodnost předpisů při hodnotě Hillovy konstanty $n = 1$ (viz kapitola 7.2.2). Fitovat Hillovu rovnici je v tomto případě výhodnější, jelikož jsou zároveň obsaženy oba vztahy.

Numericky jsou pak nalezeny parametry, při kterých je suma čtverců T co možná nejmenší.

Výsledné parametry jsou: $\log_{10}(K) = 0,360 \mu\text{mol}$; $n = 0,848$.

10.1.3 Modelování účinnosti remdesiviru v závislosti na jeho koncentraci

Pro přehlednější vykreslení grafu bude účinnost vyobrazována procentuálně a koncentrace remdesiviru ve formě dekadického logaritmu s jednotkou μmol .



Graf 9 – Křivka řídicí se podle Hillovy rovnice naitovaná na původní datové body remdesiviru

Na grafu jsou vykreslena jak černě zbarvená původní data, tak i červeně zbarvená křivka, která se řídí podle předpisu Hillovy rovnice. Z této křivky lze následně vyčíst účinnost léčiva při libovolné koncentraci.

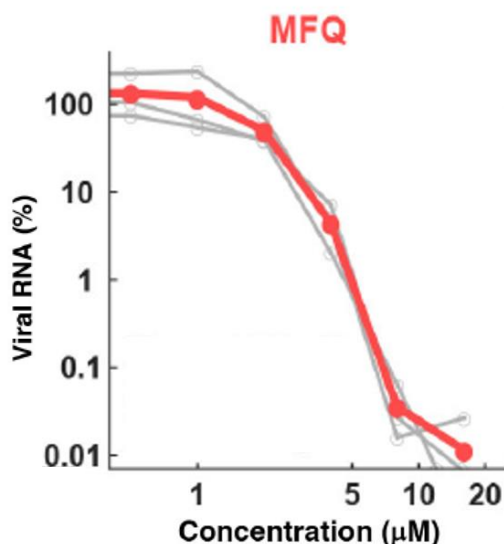
10.2 Odhadování reálných parametrů inhibitorů virové infekce

Zástupcem z řad inhibitorů virové infekce je léčivo s názvem meflochin, který funguje na principu inhibice průniku viru do buňky. Toto léčivo (původně antimalarikum) začalo být testováno vůči onemocnění COVID-19 jako antivirotikum již na počátku pandemie. Meflochin je dále popisován v teoretické části práce (viz kapitola 2.1.2).

10.2.1 Extrakce dat z grafu popisujícího účinnost meflochinu při jeho různých koncentracích

Extrakce dat z grafu je principiálně stejná jako ta u remdesiviru. Rozdíly jsou pouze v osách grafu.

Pro osu x grafu popisující koncentraci samotného léčiva nebyl použit dekadický



Obrázek 3 – Závislost výskytu infekčních virových jednotek na použité koncentraci meflochinu (zdroj datových bodů) – (SHIONOYA, 2021)

logaritmus. Informace o typu použitého logaritmu ovšem v popisu grafu nejsou uvedeny. K řešení tohoto problému je použita jedna z funkcí programu používaného na digitalizaci dat (viz metodika).

Osa y se liší v údajích, který popisuje. Zatímco v grafu užívaném pro extrakci parametrů remdesiviru byla osou y popisována dosažená efektivita léčiva, v tomto grafu je monitorováno množství infekčního RNA v systému. Výsledná efektivita bude tedy spočítána pomocí rovnice $\varepsilon = \frac{V_0}{V_x}$, kdy V_x vyjadřuje úbytek ve virové náloži a V_0 virovou nálož před použitím léčiva.

Koncentrace je stejně, jako tomu bylo u remdesiviru, uváděna v jednotkách µmol. Účinnost je uváděna procentuálně.

10.2.2 Odhadování reálných parametrů meflochinu z dat

Princip odhadování reálných parametrů je v porovnání s tím, který byl prováděn při dopočítávání parametrů remdesiviru, téměř identický. Jediným rozdílem je zlomek používaný pro výpočet účinnosti pomocí změny virové nálože po aplikaci léčiva. Ten je vůči tomu, který byl používaný u výpočtu parametrů remdesiviru, převrácený. Kvůli tomu

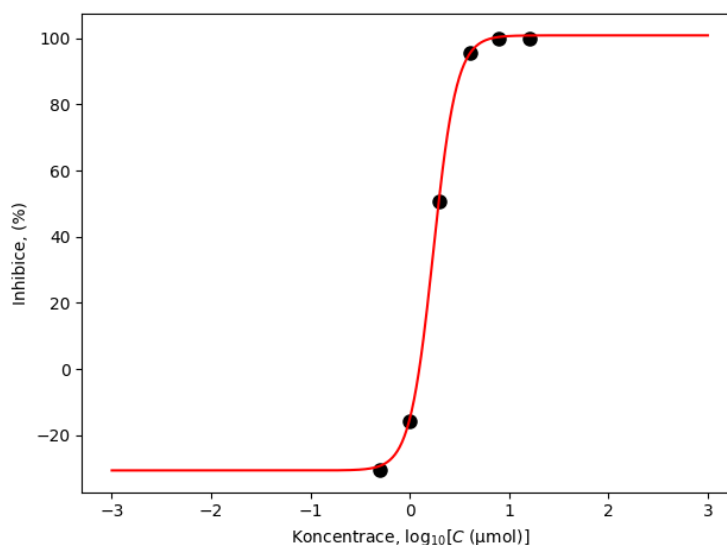
je nutné, abychom na konci výpočtů převedli Hillovu konstantu n na její opačnou hodnotu.

Výsledné parametry jsou: $n = 3,693$; $\log_{10}(K) = 0,235$

10.2.3 Modelování účinnosti meflochinu v závislosti na jeho koncentraci

Pro zachování možnosti porovnat křivky vykreslené u modelování účinnosti remdesiviru s křivkou efektivity meflochinu byla osa y převedena z míry výskytu infekčního RNA na míru inhibice (použita hodnota pro Hillovu konstantu n je 3.693.)

Výsledkem je křivka připomínající právě tu, která byla vykreslena pro zobrazení účinnosti remdesiviru při jeho různých koncentracích. Rozdílem je značně vyšší strmost



Graf 10 – Křivka řídicí se podle Hillovy rovnice naitována na původní datové body meflochinu (použita kladná hodnota Hillovy konstanty n)

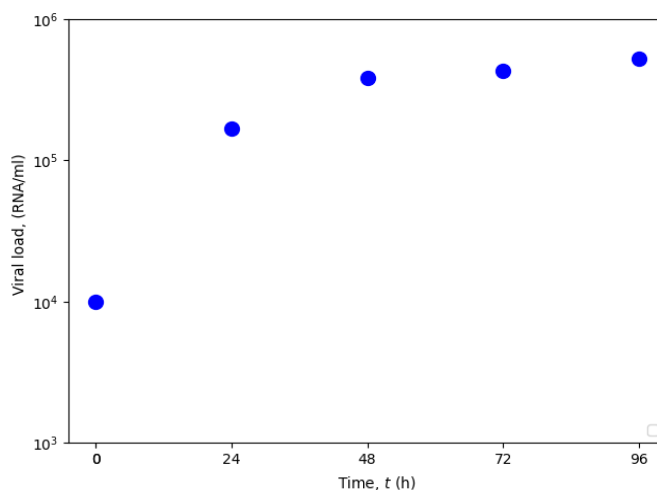
této křivky oproti křivce popisující účinnost remdesiviru.

11 ODHADOVÁNÍ REÁLNÝCH PARAMETRŮ ONEMOCNĚNÍ COVID-19

Proces zjišťování parametrů onemocnění je obdobný tomu, který byl používán pro zjišťování parametrů konkrétních léčiv (viz kapitola 8). Z toho důvodu se tato část bude spíše zaměřovat na aspekty, které jsou vůči zjišťování parametrů léčiv rozdílné.

V první řadě je potřeba zajistit data, na která se bude fitovat křivka koncentrace viru V , kterou získáme numerickým řešením systému diferenciálních rovnic. Těchto dat musí být dosaženo bez použití jakýchkoliv léčiv, která by ovlivnila průběh onemocnění. K tomuto účelu je ideální používat data, která byla získána během kontrolních experimentů, které jsou součástí velkého množství studií.

Graf splňující zmíněné požadavky, který byl pro tyto účely vybrán, na ose x obsahuje



Obrázek 4 – Průběh virového onemocnění COVID-19 (zdroj datových bodů) – (BERNHAUEROVÁ, 2021)

informaci o časových intervalech mezi jednotlivými měřeními. Na ose y je pak popsána koncentrace virové nálože, a to ve formě dekadického logaritmu v jednotkách RNA /ml.

Z grafu jsou následně data extrahována stejným způsobem, jakým byl tento proces prováděn u léčiv.

Fitování křivky na data též probíhá podobně jako u léčiv. Liší se ovšem tím, že nemáme k dispozici předpis rovnice, jelikož se průběh onemocnění vyjadřoval pomocí systému diferenciálních funkcí.

Funkce je nejdříve nutné vyřešit. Mezi výchozí podmínky patří: $V = 10^4 \text{ RNA/ml}$, $S = 10^5$ buněk. Aby byly rovnice vypočitatelné, jsou dosazeny i parametry, které ovšem budou během fitování upraveny tak, aby výsledná křivka co možná nejlépe vystihovala pozici původních dat. Jediný parametr, který během fitování změněn nebude, je rychlost, se kterou zanikají virové jednotky c . Ta je v této konkrétní simulaci rovna nule, jelikož

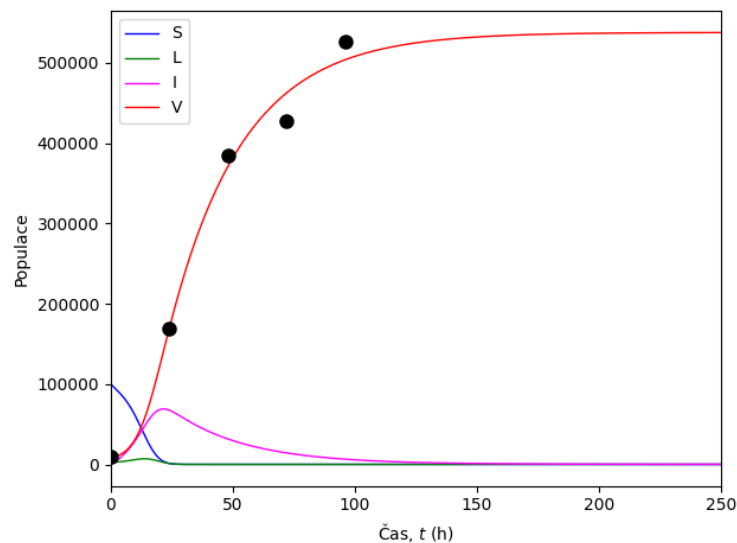
metoda, se kterou je virová nálož V měřena, kalkuluje celkový počet RNA v systému, nikoliv množství infekčních virových jednotek. Strukturální stabilita RNA viru je v průběhu experimentu stabilní (BERNHAUEROVÁ, 2021).

Po vyřešení těchto rovnic jsou opět vytvořena rezidua v časových bodech, ve kterých jsou naměřena původní data. Hodnoty těchto reziduí jsou následně zadány do speciální funkce, pomocí které jsou dopočítány reálné parametry infekce.

Parametry onemocnění COVID-19 mají ve finální verzi hodnoty: $\log_{10}\beta = -5,5138 \frac{1}{\text{virus}\cdot\text{h}}$; $\log_{10}k_L = -0,0390 \text{ h}^{-1}$; $\log_{10}k_I = -1,4803 \text{ h}^{-1}$; $\log_{10}p = -0,7577 \frac{\text{virus}}{\text{buňka}\cdot\text{h}}$; $c = 0 \text{ h}^{-1}$

11.1 Modelování onemocnění COVID-19 za použití reálných parametrů

K vykreslení modelu onemocnění COVID-19 je použita soustava čtyř diferenciálních rovnic. Každá ze složek, mezi které patří zdravé buňky S , latentní buňky L , infekční buňky



Graf 11 – Křivky řídicí se podle systému diferenciálních rovnic (4) nafiťované na původní datové body popisující průběh onemocnění COVID-19

I a virové jednotky V , je pak kvantitativně sledována. Pro zachování možnosti porovnání původních datových bodů s výsledným modelem onemocnění jsou zachovány počáteční podmínky používané ve výchozím modelu (viz obrázek 4), tj. $S = 10^5$ buněk, $V = 10^4$ RNA/ml.. Datové body jsou vykresleny černou barvou.

Změny v parametrech oproti základnímu modelu onemocnění (grafu 2) se manifestovaly různými způsoby. Největší rozdíly jsou ve křivce sledující virovou nálož, která se po

vyplývání zásoby zdravých buněk S nesnižuje, ale zůstává stále stejná. Důvodem je právě nulový parametr c , který ovlivňuje rychlost umírání virových jednotek V .

12 VLIV LÉČIV NA PRŮBĚH ONEMOCNĚNÍ COVID-19

Tato část práce se bude zaměřovat na popsání hlavního cíle práce, kterým je porovnávání vlivů inhibitorů produkce virových jednotek a inhibitorů virové infekce na průběh onemocnění COVID-19. Porovnávány budou zástupci obou kategorií léčiv, jejichž parametry byly zjišťovány v předešlé kapitole, tj. remdesivir a meflochin.

12.1 Porovnávání vlivů meflochinu a remdesiviru na průběh virového onemocnění COVID-19

Finální aplikace inhibitorů do modelu onemocnění je výsledkem kombinace, rozšířeného matematického modelu onemocnění (viz kapitola 6.2) a matematického modelu účinnosti léčiv (viz kapitola 7.2.2). Finální model onemocnění COVID-19 s přidaným inhibitorem virové infekce má pak tvar:

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt} &= -\beta \cdot \left(1 - \varepsilon_{max} \cdot \frac{C^n}{K^n + C^n}\right) \cdot S \cdot V \\ \frac{dL}{dt} &= \left(1 - \varepsilon_{max} \cdot \frac{C^n}{K^n + C^n}\right) \cdot \beta \cdot S \cdot V - k_L \cdot L \\ \frac{dI}{dt} &= k_L \cdot L - k_I \cdot I \\ \frac{dV}{dt} &= p \cdot I - c \cdot V,\end{aligned}\tag{11}$$

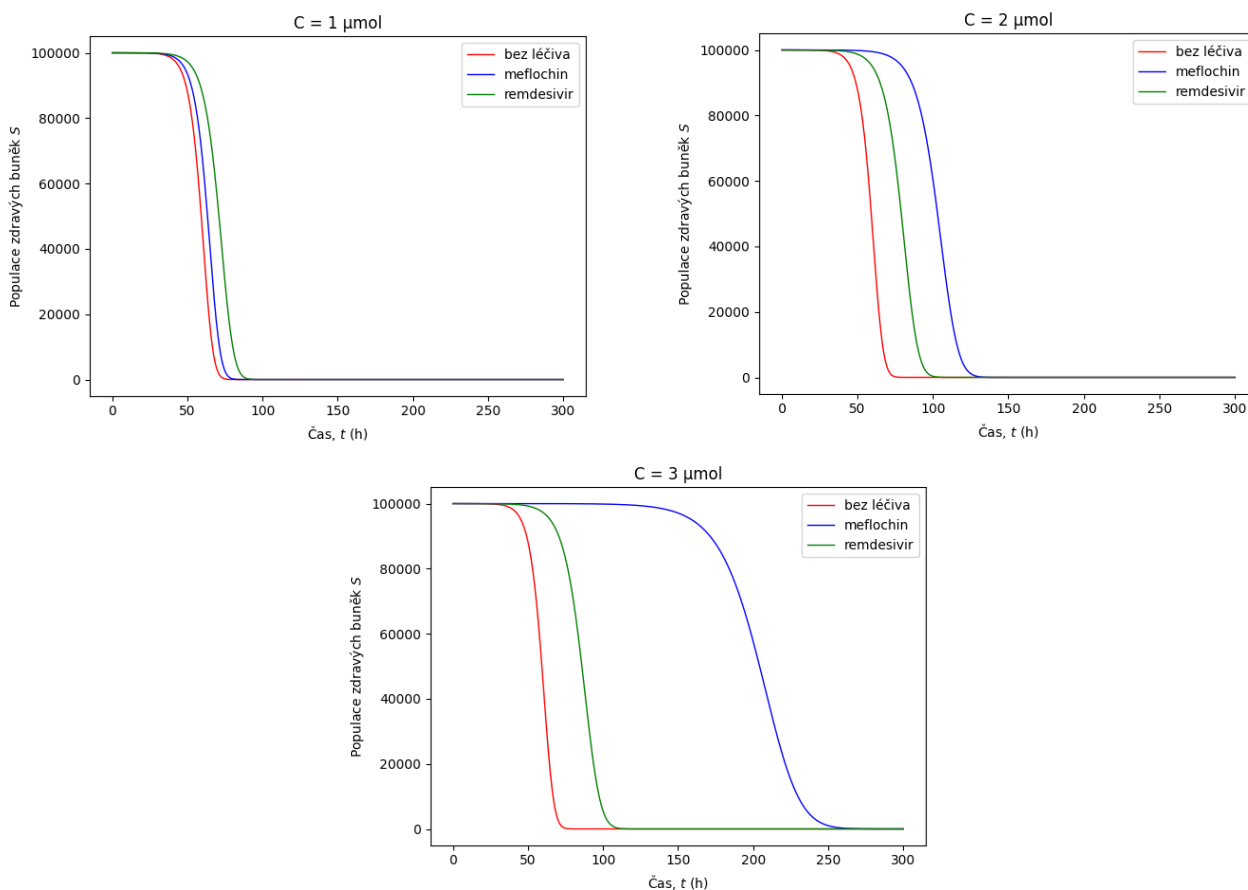
zatímco finální matematický modelem onemocnění COVID-19 s přidaným inhibitorem produkce virových jednotek má tvar:

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt} &= -\beta \cdot S \cdot V \\ \frac{dL}{dt} &= \beta \cdot S \cdot V - k_L \cdot L \\ \frac{dI}{dt} &= k_L \cdot L - k_I \cdot I \\ \frac{dV}{dt} &= \left(1 - \varepsilon_{max} \cdot \frac{C^n}{K^n + C^n}\right) \cdot p \cdot I - c \cdot V\end{aligned}\tag{12}$$

Pro porovnání bude též zahrnut základní model onemocnění (viz kapitola 9.1) Složky budou v zájmu zachování přehlednosti porovnávány samostatně.

Všechny vykreslované modely budou mít stejné počáteční podmínky, tj. $S = 10^5$ buněk, $V = 1$ RNA/ml. Vliv léčiva na jednotlivé populace se bude testovat celkem 2 různých koncentracích samotných léčiv. Užívané budou takové hodnoty koncentrací léčiv, které způsobí vykreslení grafu, na kterém budou zřetelně viditelné mechanismy, podle kterých se řídí průběh onemocnění COVID-19. Hodnoty jsou: $C = 1 \mu\text{mol}$, $C = 2 \mu\text{mol}$ a $C = 3 \mu\text{mol}$.

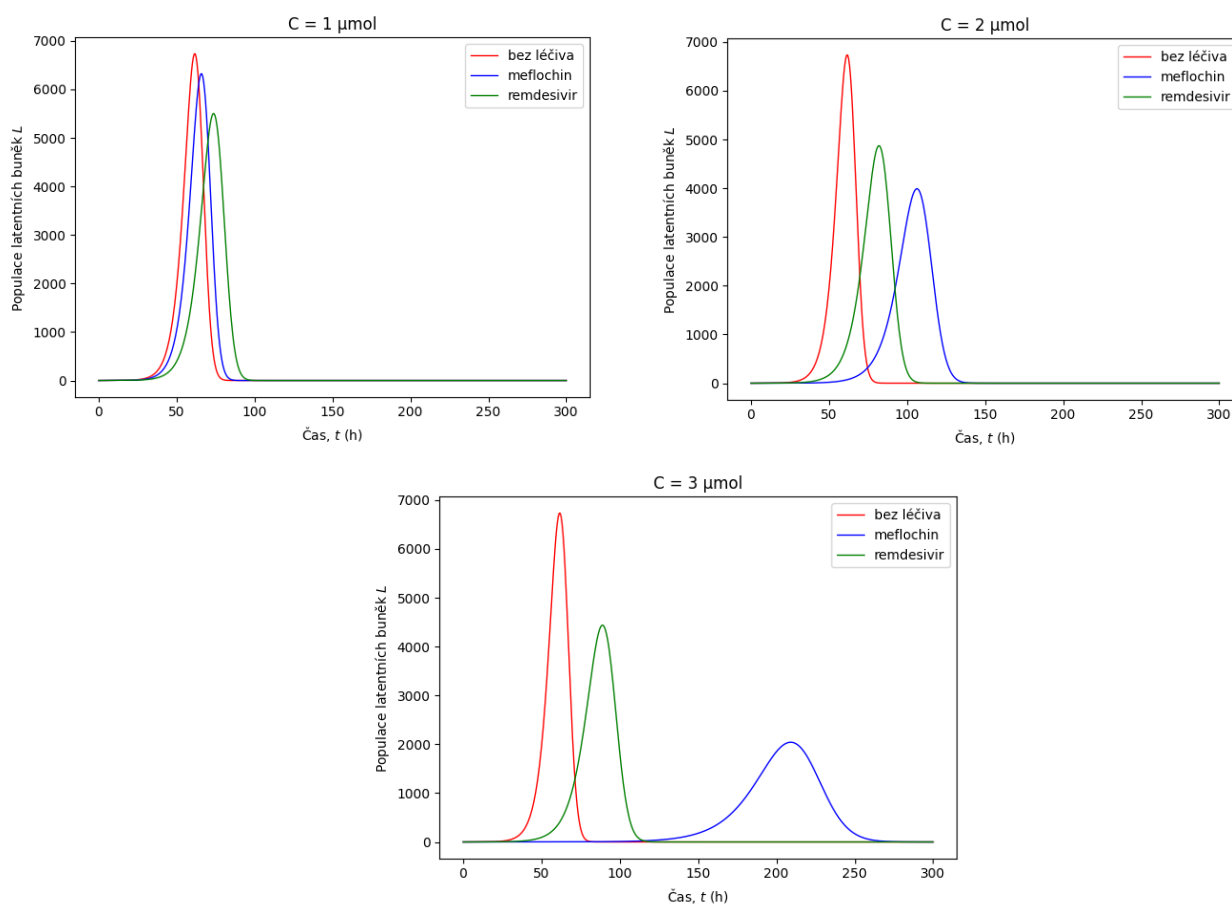
12.1.1 Porovnávání populací zdravých buněk



Graf 12 – Vyobrazení modelů vývoje populací zdravých buněk S v průběhu onemocnění COVID-19 při různých koncentracích meflochinu a remdesiviru a jejich porovnání s modelem vývoje populace zdravých buněk S v průběhu onemocnění COVID-19 bez použití léčiva

Při porovnávání populací zdravých buněk je zřejmé, že remdesivir je účinnější v potlačování nemoci jen při nejnižší zadané hodnotě koncentrace, tj. $1 \mu\text{mol}$. Čím vyšší koncentrace léčiva je pak použita, tím je meflochin oproti remdesiviru účinnější. Ve všech uvedených hodnotách koncentrací léčiv jsou ovšem modely s léčivou časově posunuty oproti modelu, ve kterém léčivo použito nebylo. Všechny vykreslené modely populací končí v nulových hodnotách kvůli jejich konverzi všech zdravých buněk v buňky latentní.

12.1.2 Porovnávání populací latentních buněk

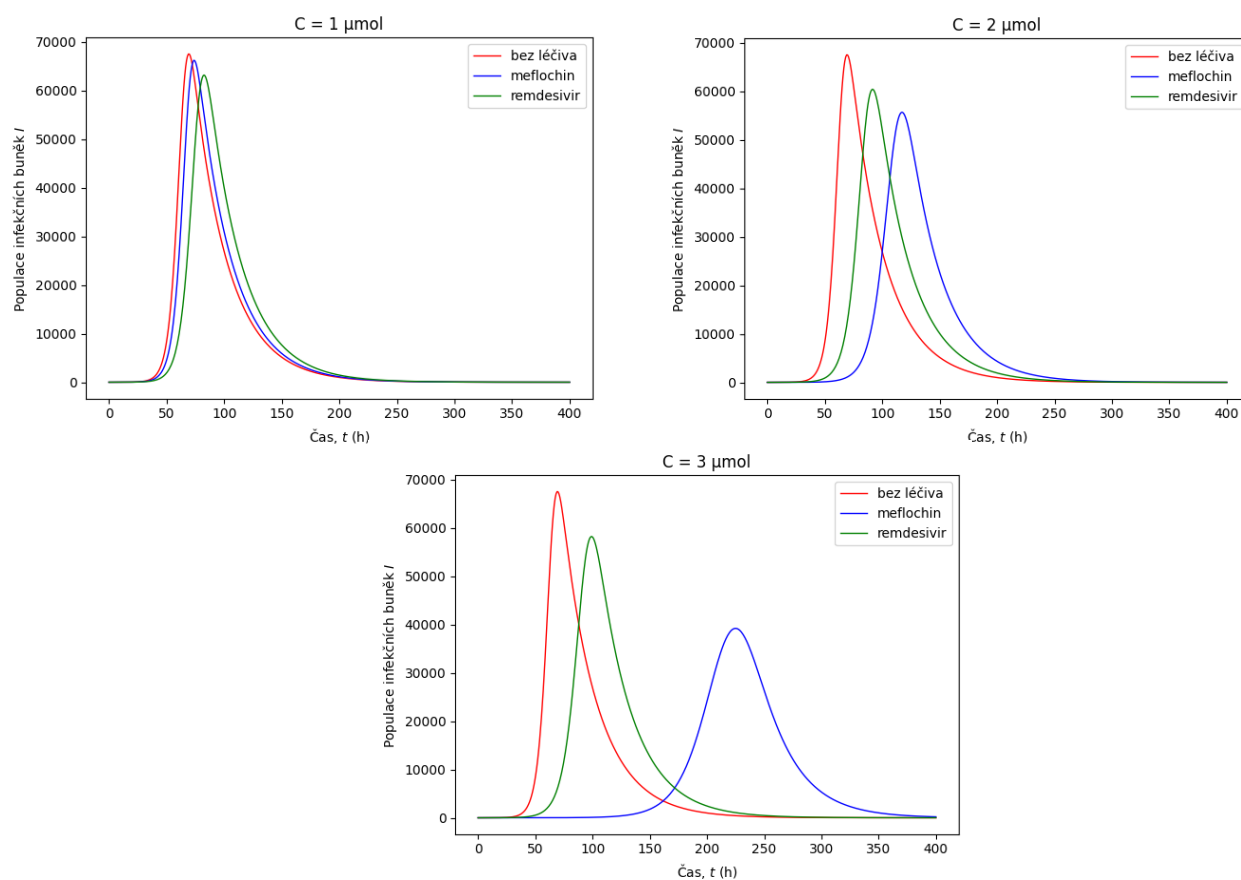


Graf 13 – Vyobrazení modelů vývoje populací latentních buněk L v průběhu onemocnění COVID-19 při různých koncentracích meflochinu a remdesiviru a jejich porovnání s modelem vývoje populace latentních buněk L v průběhu onemocnění COVID-19 bez použití léčiva

Na populacích latentních buněk je opět zřejmé, že remdesivir je účinnější než meflochin jen při nižší dávce 1 μmol . Tato vyšší účinnost se projevuje jak časovým posunem, tak i maximem, kterého populace dosahují. Toto maximum je ve všech grafech nejvyšší u modelu, ve kterém nebyla použita žádná léčiva. U modelů s léčivy též maximum přichází dříve než u modelů s aplikovanými léčivy.

V rostoucí koncentrací léčiv se meflochin opět stává více efektivním, což se projevuje v jak ve výši maxima, tak i v časovém bodě, ve kterém maxima dosahuje. Tyto rozdíly se stávají více výraznými s rostoucí koncentrací.

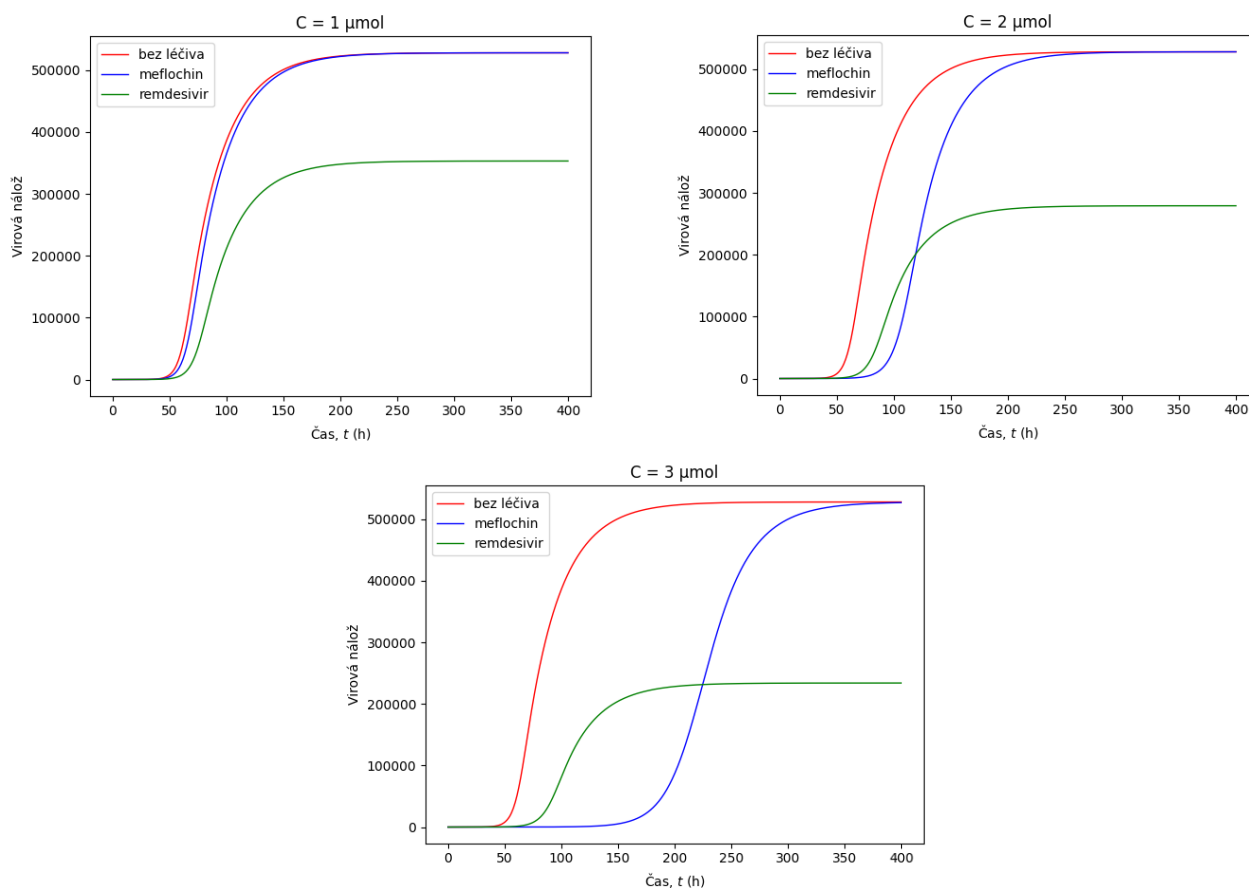
12.1.3 Porovnávání populací infekčních buněk



Graf 14 – Vyobrazení modelů vývoje infekčních buněk I v průběhu onemocnění COVID-19 při různých koncentracích meflochinu a remdesiviru a jejich porovnání s modelem vývoje infekčních buněk I v průběhu onemocnění COVID-19 bez použití léčiva

Na populacích infekčních buněk je možné vidět podobný trend, který se objevoval u buněk latentních. Křivka modelu s remdesivirem má opět nejnižší maximum pouze při nízkých hodnotách koncentrace.

12.1.4 Porovnávání virových náloží



Graf 15 – Vyobrazení modelů vývoje virové nálože v průběhu onemocnění COVID-19 při různých koncentracích meflochinu a remdesiviru a jejich porovnání s modelem vývoje virové nálože v průběhu onemocnění COVID-19 bez použití léčiva

Při nejmenších koncentracích léčiv lze pozorovat poměrně velký časový posun i pokles u křivky popisující průběh onemocnění COVID-19 s aplikovaným remdesivirem. Meflochin na druhé straně při těchto hodnotách koncentrace nemá téměř žádný vliv na průběh onemocnění.

S vyššími hodnotami koncentrací léčiv se u obou křivek s léčivem zvětšuje časový posun oproti modelu bez aplikovaných léčiv. Zatímco u remdesiviru se snižuje maximum, kterého virová nálož dosáhne, u modelu s meflochinem je maximum stejné jako u modelu bez léčiva.

Stejně tomu je i u grafu popisující průběh onemocnění COVID-19 při nejvyšších aplikovaných koncentracích léčiva. Značný rozdíl zde ovšem můžeme najít v časovém posunu maxima křivky s meflochinem oproti křivce bez léčiva. Tento posun je u meflochinu více vyjádřen než u remdesiviru. Remdesivir má ovšem výhodu v jeho stále se snižujícím maximu.

DISKUZE

V průběhu práce bylo dosaženo všech cílů, které byly v úvodu stanoveny. Dále bude rozebráno, jaké jsou tyto výsledky ve srovnání se vstupními hypotézami a ve srovnání s ostatními pracemi, které byly publikovány na podobné téma.

První stanovenou této práce hypotézou byly předpokládáné lepší antivirotické účinky u inhibitorů produkce virových jednotek. Hypotéza nakonec nebyla pomocí výsledků a vykreslení porovnání těchto dvou typů léčiv při stejné efektivitě potvrzena ani vyvrácena. U inhibitorů produkce virových jednotek bylo pozorovatelné výrazně nižší maximum křivky popisující stav virové nálože V . Inhibitory virové infekce ovšem vykazovaly větší časové prodlevy při dosahování maximálních hodnot u latentních buněk L , infekčních buněk I a virové nálože V a minimálních hodnot zdravých buněk S oproti modelu bez aplikovaných léčiv.

Druhá hypotéza, která říkala, že právě ten typ inhibitoru, který bude v obecném porovnání inhibitorů virové infekce a inhibitorů produkce virových jednotek vykazovat lepší účinky, bude mít v závěrečném porovnávání i úspěšnějšího zástupce, nebyla zcela potvrzena ani vyvrácena. Při sledování populací zdravých, latentních a infekčních buněk byl zástupce kategorie inhibitorů produkce virových jednotek, remdesivir, účinnější než zástupce kategorie inhibitorů virové infekce, meflochin, ale jen při nižších sledovaných koncentracích léčiv ($C = 1 \mu\text{mol}$). Při vyšších koncentracích ($C = 2 \mu\text{mol}$; $C = 3 \mu\text{mol}$) byly v těchto populacích zřetelně viditelné výhody meflochinu, jehož aplikování způsobovalo znatelně větší časové prodlevy.

Výraznější inhibice virové nálože byla ovšem viditelná u remdesiviru, kde maxima virové nálože při vyšších koncentracích léčiva dosahovala jen poloviny těch, které byly viditelné při aplikaci stejných koncentrací meflochinu. Je tedy zřejmé, že právě remdesivir je na rozdíl od meflochinu schopný snížit celkové vyprodukované množství virových jednotek.

To může zároveň být i důvodem, proč byl během pandemie COVID-19 právě remdesivir více klinicky používaným léčivem. Dalším důvodem by mohly být v literatuře často zmiňované vedlejší psychologické účinky meflochinu jako úzkost, záchvaty paniky, paranoia, amnézie či násilné a sebevražedné chování (RITCHIE et al., 2013). V jiných studiích jsou ovšem uváděny jen minimální projevy toxicity u pacientů léčených meflochinem (STYKA et al., 2020). Žádná z těchto studií ovšem není vztažená na onemocnění COVID-19, jelikož v tomto ohledu není toxicita meflochinu dostatečně prozkoumaná. Se stejným nedostatkem informací se setkáváme ale i v případě remdesiviru, u kterého je možná vyšší míra toxicity při vyšších dávkách (CHAMARY et al., 2021). Mezi vedlejší efekty remdesiviru se řadí zejména hypertenze, hyperglykemie, nevolnost, konstipace či bolest hlavy (ALEEM et al., 2022).

Dalším cílem této práce s daty, která byla publikována v rámci jiných studií na podobné téma. Jelikož je téma matematického modelování poměrně nové, velká část našich výsledků je obtížně srovnatelná z důvodu nízkého počtu podobných prací v literatuře.

Jedním z výsledků této práce, který je porovnatelný s výsledky prací jiných, jsou částečně parametry léčiv. Half-saturation constant je totiž často uváděná při modelování účinnosti těchto léčiv. V případě původních dat Meflochinu se jedná o hodnotu 1,28 μmol . Tato hodnota se od zjištěné hodnoty v rámci této práce liší o zhruba 0,437 μmol (SHIONOYA et al., 2021). Důvodem této odchylky je pravděpodobně fitování křivky, které (vzhledem k charakteru grafu) nebylo ve citované studii prováděno. Původem odchylky by také mohlo být to, že v původní studii byly hodnoty half-saturation constant vyvozovány z triplikátů, zatímco v této práci byly digitalizovány pouze průměry těchto bodů.

Co se výsledných parametrů onemocnění COVID-19 týče, studie prováděné na podobné téma kvůli odlišným cílům a postupům často používají jiné základní modely. Kvůli rozdílnostem těchto modelů je pak složitější porovnávat výsledné parametry.

Tuto práci je nepochybně možné rozšířit, ať už rozšířením studovaného spektra dat či přidáváním dalších aspektů do základního modelu onemocnění.

Koncepty popisované a používané v průběhu této práce jsou obecně široce využitelné, jelikož je možné tímto způsobem poměřovat účinnosti a vlivy různých druhů antivirotik. Tento typ práce s daty je též finančně úsporný, jelikož snižuje počet nutných měření pro porovnání léčiv v daných hodnotách koncentrace. Pomocí matematického modelování, jak bylo ukázáno v práci, není nutné sledovat vývoj v každé z populací ve velkém množství časových bodů. Je ovšem nutné podotknout, že v každém ze zmíněných případů je větší množství dat prospěšné, jelikož je možné vytvořit přesnější výslednou křivku.

ZÁVĚR

V této práci bylo s pomocí metod matematického modelování provedeno porovnání vlivů inhibitorů produkce virových jednotek a inhibitorů virové infekce. Dále byla odhadována účinnost meflochinu a remdesiviru při jejich libovolných koncentracích a byl charakterizován průběh růstu virové nálože SARS-CoV-2 v čase. Následně byly vykresleny a porovnány účinky meflochinu a remdesiviru na průběh virového onemocnění COVID-19.

Při matematickém modelování byla využita řada postupů, mezi které patří fitování křivky na graf a zjišťování parametrů léčiv i onemocnění COVID-19 pomocí programovacího jazyku Python či extrakce dat z grafů pomocí programu „PlotDigitizer“. Základem celé práce jsou ovšem samotné rovnice onemocnění sestavené pomocí dostupných informací.

Z vyobrazení účinků inhibitorů virové infekce v porovnání s účinky inhibitorů produkce virových jednotek vyplývají graficky doložitelná zjištění nižšího maxima křivky popisující změny ve virové náloži V u inhibitorů produkce virových jednotek. U inhibitorů produkce virové infekce jsou ovšem zřetelné vyšší časové prodlevy pro dosažení maximálních hodnot latentních buněk L , infekčních buněk I a virové nálože V a minimálních hodnot u zdravých buněk S .

Remdesivir byl porovnáván s meflochinem za použití konkrétních parametrů léčiv i onemocnění COVID-19. Při nižších koncentracích vykazoval větší časové prodlevy u všech čtyř sledovaných složek a nižší maxima u všech složek, kromě zdravých buněk S (jejich maxima vycházejí z počátečních podmínek). Při vyšších koncentracích léčiv byly ovšem u meflochinu pozorovatelné větší časové prodlevy než u remdesiviru. Maxima křivek popisujících populace latentních a infekčních buněk jsou též nižší, než tomu je při stejných koncentracích u remdesiviru. Na grafických výstupech práce je také vidět, že s rostoucí koncentrací se rozdíl v časových prodlevách pouze zvětšují v prospěch meflochinu. Bylo zjištěno, že změna nastává u křivky sledující změny ve virové náloži, kde jsou sice znatelné větší časové prodlevy při použití meflochinu, ale míra vyprodukované virové nálože je výrazně nižší u křivek s remdesivirem. Rozdíly v míře vyprodukované virové nálože se s rostoucí koncentrací pouze zvyšují.

K dalším výsledkům této práce patří zjištění účinnosti remdesiviru a meflochinu při různých koncentracích. Byly též zjištěny stavy populací zdravých buněk S , latentních buněk L , infekčních buněk I a virové nálože V v libovolném čase, a to jak bez použití antivirotik, tak i s použitím remdesiviru či meflochinu.

Úspěšné fitování křivky řídící se podle systému diferenciálních rovnic (4) na datové body popisující průběh virového onemocnění (viz obrázek 4) potvrzuje, že mnou sestavený matematický model onemocnění COVID-19 výstižně reflektuje průběh tohoto virového onemocnění v in vitro experimentech na Vero buňkách.

Výsledky této práce jsou prakticky využitelné zejména v oboru farmaceutiky, kde se mohou sloužit k určování dávek různých léků pro dostavení žádoucího efektu. Sestrojené rovnice a používané postupy mohou být využity k porovnání efektů jiných léků na různá onemocnění. Využitelné jsou též parametry remdesiviru, meflochinu a onemocnění COVID-19, které mohou sloužit k jejich matematickému modelování za různých podmínek.

Literární zdroje

1. ANAND, N. a S. SHARM. Approaches to Design and Synthesis of Antiparasitic Drugs. Elsevier, 1997.
2. LEHNINGER, Albert L., David L. NELSON a Michael M. COX. Lehninger principles of biochemistry. 6th ed. New York: W.H. Freeman, c2013. ISBN 978-1429234146.
3. NOWAK, Martin A. a Rober M. MAY. Virus dynamics. New York: Oxford university press, 2000. ISBN 0-19-850417-9.

Internetové zdroje

1. ALEEM, Abdul a Jiten P. KOTHADIA. Remdesivir. Medical Microbiology. National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 8. září 2022 [cit. 2023-02-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563261/>
2. ANHALT, Cynthia Oropesa a Ricardo CORT. MATHEMATICAL MODELING: A STRUCTURED PROCESS. MATHEMATICS TEACHER [online]. 2015, 106(6), 447-451 [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/302560505_Mathematical_Modeling_A_Structured_Process
3. ANTONIADIS, Panagiotis. Introduction to Curve Fitting. Baeldung [online]. Str. Dambului, nr. 96, et. 1, ap. 3, Bucharest, Romania: Tarnum Java SRL, 2020, 6. listopadu 2022 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://www.baeldung.com/cs/curve-fitting>
4. BAYLISS, Alvin a Vladimir VOLPERT. Mathematical Biology. McCormick School of Engineering [online]. 2145 Sheridan Road, Evanston, IL 60208: Robert R. McCormick School of Engineering and Applied Science, Northwestern University, 1999, 2015 [cit. 2023-02-12]. Dostupné z: <https://www.mccormick.northwestern.edu/applied-math/research/areas/mathematical-biology.html>
5. BERNHAUEROVÁ, Veronika, Bartek LISOWSKI, Veronica V. REZELJ a Marco VIGNUZZI. Mathematical modelling of SARS-CoV-2 infection of human and animal host cells reveals differences in the infection rates and delays in viral particle production by infected cells. Journal of Theoretical Biology [online]. 2021, 531 [cit. 2023-02-12]. ISSN 00225193. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jtbi.2021.110895](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2021.110895)
6. BOLDOGH, Istvan, Thomas ALBRECHT a David D. PORTER. Medical Microbiology. National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 1996 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8538/>

7. CANN, A.J. Replication of Viruses. Medical Microbiology. National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 2008 [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7173441/>
8. CHAMARY, J. V. The Strange Story Of Remdesivir, A Covid Drug That Doesn't Work. Forbes [online]. New York City: OpenWeb, 1996, 31. ledna 2021 [cit. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://www.forbes.com/sites/jvchamary/2021/01/31/remdesivir-covid-coronavirus/?sh=4fbce8db66c2>
9. CUEMATH. Differential Equations. CUEMATH [online]. 3rd Floor, 80 Feet Road, 4th Block, Koramangala, Bengaluru - 560034 Karnataka, India: Cue Learn Private Limited, 2013, 2019 [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: <https://www.cuemath.com/calculus/differential-equation/>
10. ESKE, Jamie. What is the difference between in vivo and in vitro?. Medical News Today [online]. Brighton, UK: Healthline Media UK Ltd, Brighton, UK, a Red Ventures Company, 2004, 31. října 2020 [cit. 2023-02-13]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/in-vivo-vs-in-vitro>
11. ESSAIDI-LAZIOSI, Manel, Francisco Javier PEREZ RODRIGUEZ, Nicolas HULO, Frederique JACQUERIOZ, Laurent KAISER a Isabella ECKERLE. Estimating clinical SARS-CoV-2 infectiousness in Vero E6 and primary airway epithelial cells. The Lancet Microbe [online]. 2021, 27. srpna 2021, 2(11) [cit. 2023-02-16]. ISSN 26665247. Dostupné z: doi:10.1016/S2666-5247(21)00216-0
12. GESZTELYI, Rudolf, Judit ZSUGA, Adam KEMENY-BEKE, Balazs VARGA, Bela JUHASZ a Arpad TOSAKI. The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology. Archive for History of Exact Sciences [online]. 2012, 66(4), 427-438 [cit. 2023-02-11]. ISSN 0003-9519. Dostupné z: doi:10.1007/s00407-012-0098-5
13. GOUTELLE, Sylvain, Michel MAURIN, Florent ROUGIER, Xavier BARBAUT, Laurent BOURGUIGNON, Michel DUCHER a Pascal MAIRE. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. Wiley Online Library [online]. John Wiley, 2000, 28. listopadu 2008 [cit. 2023-02-11]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x>
14. GUENGERICH, F. Peter. Mechanisms of Drug Toxicity and Relevance to Pharmaceutical Development. Medical Microbiology. National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 22. srpna 2010 [cit. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4707670/>
15. KAUSAR, Shamaila, Fahad SAID KHAN, Muhammad ISHAQ MUJEEB UR REHMAN, et al. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 16. května 2016 [cit.

- 2023-02-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7975490/>
16. KEJNOVSKÝ, Eduard. Jsou viry živé?. Příroda.cz [online]. Příroda.cz, 2004, 2017 [cit. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://www.priroda.cz/clanky.php?detail=2910>
 17. KRAMER, Laura D. Overview of Viral Infections. MSD Manual [online]. USA: Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA and its affiliates, 2021 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://www.msmanuals.com/home/infections/overview-of-viral-infections/overview-of-viral-infections>
 18. LOUTEN, Jennifer. Virus Replication. National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 6. května 2016 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7149683/#s0065>
 19. RACANIELLO, Vincent. Acute viral infections. Virology blog [online]. USA, 13. února 2009 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://www.virology.ws/2009/02/13/acute-viral-infections/>
 20. RITCHIE, Elspeth Cameron, Jerald BLOCK a Remington Lee NEVIN. Psychiatric side effects of mefloquine: applications to forensic psychiatry. Medical Microbiology. National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 1988, 2013 [cit. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23771936/>
 21. SHEN, Chun Fang, Claire GUILBAULT, Xiuling LI, S. Mehdy ELAHI, Sven ANSORGE, Amine KAMEN a Rénaud GILBERT. Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. Vaccine [online]. 2019, 6. července 2019, 37(47), 6996-7002 [cit. 2023-02-13]. ISSN 0264410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2019.07.003
 22. SHIONOYA, Kaho, Masako YAMASAKI, Shoya IWANAMI, et al. Mefloquine, a Potent Anti-severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Drug as an Entry Inhibitor in vitro. Frontiers in Microbiology [online]. 2021, 2021, 12 [cit. 2023-02-17]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.651403
 23. SMITH, Amanda P., David J. MOQUIN, Veronika BERNHAUEROVA a Amber M. SMITH. Influenza Virus Infection Model With Density Dependence Supports Biphasic Viral Decay. Frontiers in Microbiology [online]. 2018, 10. července 2018, 9, 1 [cit. 2023-02-16]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.01554
 24. STYKA, A. N. a S. A. SAVITZ. Assessment of Long-Term Health Effects of Antimalarial Drugs When Used for Prophylaxis. National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 25. února 2020 [cit. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556592/>

25. ŠÍPEK, Antonín. Viry. Genetika-biologie [online]. 2010, 2014 [cit. 2023-02-03]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/viry>
26. VARDANYAN, Ruben a Victor HRUBY. Antiviral Drugs. National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 19. února 2016 [cit. 2023-02-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7149618/>
27. WHO. Coronavirus disease (COVID-19). World Health Organisation [online]. Švýcarsko, Ženeva: WHO, 1995, 2019 [cit. 2023-02-22]. Dostupné z: https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3

Citace obrázků

1. BERNHAUEROVÁ, Veronika, Bartek LISOWSKI, Veronica V. REZELJ a Marco VIGNUZZI. Mathematical modelling of SARS-CoV-2 infection of human and animal host cells reveals differences in the infection rates and delays in viral particle production by infected cells. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 2021, 531 [cit. 2023-02-12]. ISSN 00225193. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jtbi.2021.110895](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2021.110895)
2. BOLDOGH, Istvan. Natural history of acute and persistent human infections. In: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 1996 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8538/figure/A2439/?report=objectonly>
3. SCHOOLEY, Robert T., Aaron CARLIN, James R. BEADLE a Nadejda VALIAEVA. Závislost inhibice virových jednotek na použité koncentraci remdesiviru. In: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: U.S. National Library of Medicine, 1988, 26. července 2021 [cit. 2023-02-23]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34310217/#&gid=article-figures&pid=fig-4-uid-3>
4. SHIONOYA, Kaho, Masako YAMASAKI, Shoya IWANAMI, et al. Mefloquine, a Potent Anti-severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Drug as an Entry Inhibitor in vitro. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, 2021, 12 [cit. 2023-02-17]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: [doi:10.3389/fmicb.2021.651403](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.651403)