

УДК 519.95

СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РОСТА ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

© А.В. Карпенков, А.А. Арзамасцев

Karpenkov A.V., Arzamastsev A.A. Stochastic model of microorganism population growth. One of the major reasons of low reproducibility of kinetic experiments is phase heterogeneity of a population at the initial moment of time. This factor is practically unobservable because of the complex technology which defines the cell distributions on phases of a cellular cycle. The mathematical model for the decision of the problem should be stochastic, i.e. even carrying out the computing experiment in the identical conditions shows that it can reproduce various kinetic dependences. Unlike the determined model we worked out before, a different course of kinetic curves is observed in this model even in the identical initial situations, and it corresponds to experimental data in a higher degree.

Хорошо известно, что кинетика роста популяций микроорганизмов отличается недостаточной воспроизводимостью экспериментальных данных, а макрокинетические зависимости – математические модели – низкой адекватностью [1]. Причинами этого могут быть: наличие ненаблюдаемых в эксперименте факторов; недостаточно точное измерение начальных условий; неполное соответствие физико-химических механизмов, используемых в математических моделях, реальным явлениям, что приводит к зависимости их коэффициентов от различных параметров процесса [2].

По нашему мнению, одной из важнейших причин, обуславливающих низкую воспроизводимость кинетических экспериментов, является фазовая гетерогенность популяции в начальный момент времени. Этот фактор является практически ненаблюдаемым из-за сложной технологии определения распределений клеток по фазам клеточного цикла. По нашим предварительным данным, не принятие во внимание этого фактора может приводить к различиям кинетических зависимостей порядка 20–30% [2].

Целью данной работы является разработка математической модели, позволяющей выполнить оценку существенности влияния фазовой гетерогенности на кинетику роста популяций и проследить изменения распределений клеток по фазам их цикла в процессе роста популяции.

Математическая модель, предназначенная для решения указанной проблемы, должна быть стохастической, т. е. даже в одинаковых условиях проведения вычислительного эксперимента она может воспроизводить различные кинетические зависимости. Указанное обстоятельство может быть следствием различий концентраций клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла в начальный момент времени. Другими факторами, определяющими стохастический характер модели, могут являться: случайное время жизни клетки, потеря способности к делению и т. д. В отличие от детерминированной модели, разработанной нами ранее [2], в такой модели даже в абсолютно идентичных начальных ситуациях может наблюдаться различный ход кинетических кривых, что в большей степени соответствует экспериментальным данным.

Известно, что клеточный цикл разделяется на 4 фазы:

1) Фаза G1 или фаза начального роста – Интенсивные процессы биосинтеза. Образование митохондрий, хлоропластов (у растений), эндоплазматического ретикула, лизосомы, аппарата Гольджи, вакуолей и пузырьков. Ядрышко продуцирует рРНК, мРНК и тРНК; образуются рибосомы; клетка синтезирует структурные и функциональные белки. Интенсивный клеточный метаболизм, контролируемый ферментами. Рост клетки. Образование веществ, подавляющих или стимулирующих начало следующей фазы. В случае эукариот фаза G1 продолжается примерно 13 часов.

2) Фаза S или фаза удвоения молекул ДНК (репликации) – Репликация ДНК. Синтез белковых молекул, называемых гистонами, с которыми связывается каждая нить ДНК. Каждая хромосома превращается в две хроматиды. В случае эукариот фаза S продолжается примерно 5 часов.

3) Фаза G2 или фаза роста – Интенсивные процессы биосинтеза. Деление митохондрий и хлоропластов. Увеличение энергетических запасов. Репликация центриолей (в тех клетках, где они имеются) и начало образования веретена деления. В случае эукариот фаза G2 продолжается примерно 4 часов.

4) Фаза M или фаза клеточного деления – Деление ядра, состоящее из следующих стадий:

Интерфаза – Ее часто неправильно называют стадией покоя. Продолжительность интерфазы различна и зависит от функции данной клетки. Это период, во время которого клетка обычно синтезирует органеллы и увеличивается в размерах. Ядрышки хорошо видны и активно синтезируют рибосомный материал. Непосредственно перед клеточным делением ДНК и гистоны каждой хромосомы реплицируются. Каждая хромосома представлена теперь парой **хроматид**, соединенных друг с другом **центромерой**. Вещество хромосом окрашивается и носит название **хроматина**, но сами эти структуры увидеть трудно.

Профаза – Обычно самая продолжительная фаза клеточного деления. Хроматиды укорачиваются (до 4% своей первоначальной длины) и утолщаются в результате их спирализации и конденсации. При окрашива-

нии хроматиды четко видны, по центромеры не выявляются. В разных парах хроматид центромера располагается по-разному. У животных клеток и у низших растений **центриоли** расходятся к противоположным полюсам клетки. От каждой центриоли в виде лучей расходятся короткие **микротрубочки**, образующие в совокупности **звезду**. **Ядрышки** уменьшаются, т. к. их нуклеиновая кислота частично переходит в определенные пары хроматид. К концу профазы ядерная мембрана распадается и образуется веретено деления.

Метафаза – Пары хроматид прикрепляются своими центромерами к **нитям веретена** (микротрубочкам) и перемещаются вверх и вниз по веретену до тех пор, пока их центромеры не выстроятся по экватору веретена перпендикулярно его оси.

Анафаза – Это очень короткая стадия. Каждая центромера расщепляется на две, и нити веретена оттягивают дочерние центромеры к противоположным полюсам. Центромеры тянут за собой отделившиеся одна от другой хроматиды, которые теперь называются хромосомами.

Телофаза – Хромосомы достигают полюсов клетки, диспирализуются, удлиняются, и их уже нельзя четко различить. Нити веретена разрушаются, а центриоли реплицируются. Вокруг хромосом на каждом из полюсов образуется ядерная оболочка. Вновь появляется ядрышко. За телофазой может сразу следовать **цитокинез** (разделение всей клетки на две).

В случае эукариот фаза М продолжается примерно 2 часа.

Для правильной работы стохастической модели в определенной папке должен находиться текстовый файл, в котором указываются входные параметры. Например:

```
100           // Количество сгенерированных клеток
4             // Количество отрезков гистограммы
0 13 18 22 24 // Массив временных отрезков t
0 0 0 0,125 0,25 // Массив плотности распределения p
```

$\sum t \times P(x) = 1$, т. е. площадь гистограммы не должна превышать 1.

В начале обработки данных она считывает все эти параметры, затем вызывает специально написанный генератор случайных чисел. Он генерирует время для каждой клетки популяции согласно плотности распределения клеток по фазам клеточного цикла. После того, как генератор случайных чисел отработает, запускается процесс сортировки сгенерированных данных, который определяет по времени клетки, в какой фазе она находится, и записывает ее время в определенный текстовый файл. Далее стохастическая модель начинает обработку полученных данных, которые она собирает из специально сформированных файлов. В ходе работы она следит за временем каждой клетки, за их количеством в каждой фазе, за общим количеством в популяции. Для визуализации стохастическая модель выводит на экран зависимости (общее количество клеток в популяции от времени; количество клеток в каждой фазе клеточного деления) и гистограмму, которая показывает, сколько клеток находится в каждой фазе клеточного деления в данный момент времени.

Опционально в стохастической модели можно выбрать, чтобы учитывалась неспособность некоторых клеток к делению или смертность клеток, а также конечность питательного вещества.

Особенности стохастической модели:

- в процессе работы модели идет наблюдение как за популяцией в целом, так и за клетками в отдельности;
- выбор опции, при которой будет учитываться неспособность некоторых клеток к делению и гибель клеток;
- выбор опции, при которой будет учитываться конечность питательного вещества;
- можно наблюдать как за графиком роста популяции, за распределением клеток по фазам и за конкуренцией клеток в фазах в процессе работы модели.

Входные параметры стохастической модели:

- задание начального распределения клеток по фазам;
- задание начального количества клеток в популяции;
- задание временных отрезков, характеризующих длительность фаз.

Для компьютерного моделирования роста микроорганизмов и последующей обработки полученных результатов использовался комплекс программ, написанных авторами на языке *Turbo Pascal 7.0* и в среде *Delphi 7* фирмы *Borland*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Известно, что существенное влияние на кинетику роста популяции оказывают начальное распределение клеток по фазам, достаточность питательного вещества, различные внешние и внутренние факторы. Чтобы оценить, как влияет начальное распределение клеток по фазам, была написана стохастическая модель роста популяции, в которой были опущены различные внешние и внутренние факторы, конечность питательного вещества, а также смертность и неспособность некоторых клеток к делению. Таким образом, проведя ряд вычислительных экспериментов, мы могли бы визуально определить, как именно начальное распределение клеток по фазам влияет на рост популяции. Исходными данными для вычислительных экспериментов являлась плотность распределения клеток в фазах. Манипулируя начальной плотностью распределения по фазам, мы получали кинетические кривые роста популяции.

Нами были произведены вычисления для следующих ситуаций:

- все клетки находятся в фазе G1;
- все клетки находятся в фазе S;
- все клетки находятся в фазе G2;
- все клетки находятся в фазе M;
- все клетки равномерно распределены по фазам;
- все клетки равномерно распределены по фазам G1 и S;
- все клетки равномерно распределены по фазам S и G2;
- все клетки равномерно распределены по фазам G2 и M.

В первом случае (рис. 1) при одних и тех же начальных условиях получаются несущественно, но различные кинетические кривые. Но во всех случаях видно, что рост популяции начинается спустя 10 часов, затем через 15–16 часов он приостанавливается и возобновляется через 9–10 часов.

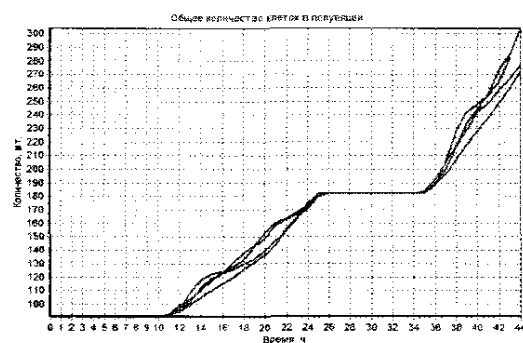


Рис. 1. Кинетические кривые роста популяции для ситуации, когда все клетки находятся в фазе G1 клеточного цикла

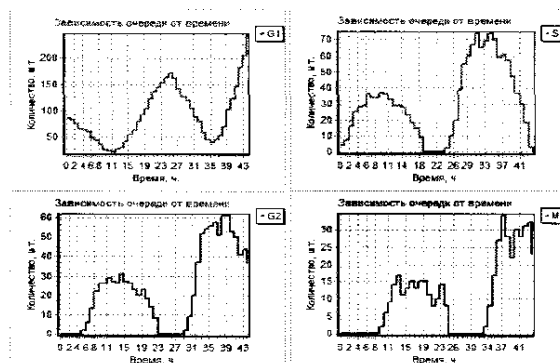


Рис. 2. Распределение клеток по фазам клеточного цикла для ситуации, когда все клетки находятся в фазе G1

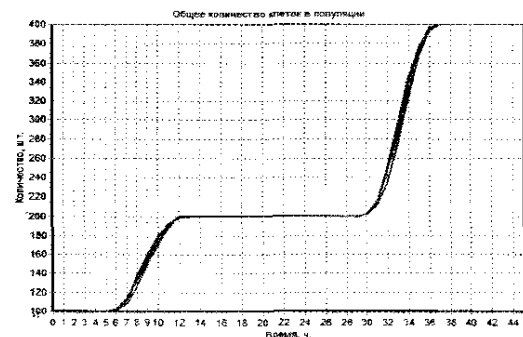


Рис. 3. Кинетические кривые ситуации, когда все клетки находятся в фазе S клеточного цикла

Это обуславливается тем, что в начальный момент времени все клетки находятся в фазе G1, и для того, чтобы начался рост популяции, нужно, чтобы часть клеток перешла через фазу M.

Распределение клеток популяции по фазам клеточного цикла на протяжении всего деления можно наблюдать на рис. 2.

Во втором случае нами была рассмотрена ситуация, когда все клетки популяции в начальный момент времени находились в фазе S. Так же как и в первом случае, рост популяции начинается не сразу, а спустя 5 часов после начала работы модели (рис. 3).

Деление клеток происходит 7 часов, затем приостанавливается на 20 часов и снова возобновляется. Пове-

дение клеток в данном эксперименте в фазах клеточного цикла можно наблюдать на рис. 4.

Следующий вариант развития событий был смоделирован для случая, когда все клетки находились в фазе G2. Как видно из рис. 5, в данной ситуации рост клеток популяции начинается спустя лишь час после начала исследования. Это обусловлено тем, что время нахождения клеток в фазах G2 и M значительно меньше, чем в G1 и S.

Рост клеток продолжается примерно 6 часов, затем на 20 часов приостанавливается. Поведение клеток в фазах клеточного цикла изображено на рис. 6.

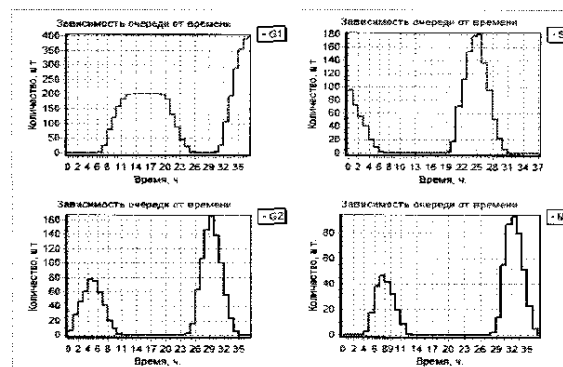


Рис. 4. Распределение клеток по фазам клеточного цикла для ситуации, когда все клетки находятся в фазе S

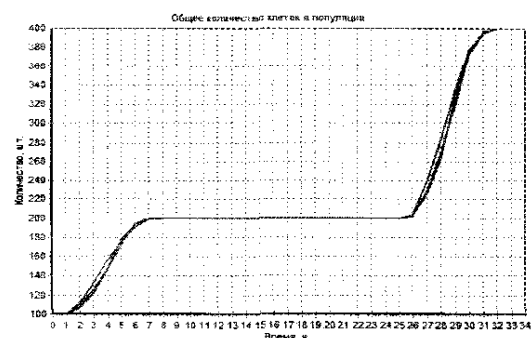


Рис. 5. Кинетические кривые ситуации, когда все клетки находятся в фазе S клеточного цикла

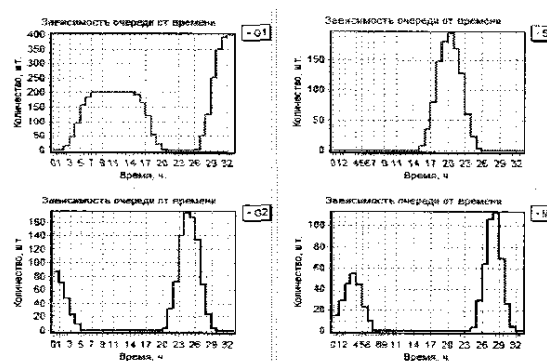


Рис. 6. Распределение клеток по фазам клеточного цикла для ситуации, когда все клетки находятся в фазе G2

В ситуации, когда все клетки находились в начальный момент времени в фазе М, рост популяции начался сразу после начала исследования. Продолжительность роста составила 3 часа (рис. 7).

В данном случае из рис. 7 видно, что кинетические кривые значительно расходятся, данная ситуация могла наблюдаться на рис. 1, когда мы рассматривали ситуацию для клеток, находящихся в фазе G1 клеточного цикла в начальный момент времени. В данном случае рост популяции прекращается на 20 часов, как и в предыдущих случаях. На рис. 8 изображено распределение клеток по фазам на протяжении всего деления для ситуации, когда все клетки находятся в фазе М.

Следующая рассмотренная нами ситуация – когда все клетки равномерно распределены по фазам клеточного цикла. Из рис. 9 видно, что в данном эксперименте кинетические кривые существенно отличаются от тех, что были получены нами ранее.

Рост популяции начинается сразу после начала исследования и не прекращается на всем протяжении эксперимента. В данном случае кинетические кривые между собой существенно отличаются, т. к. кинетическая кривая представляет собой уникальный случай, для которой стохастической моделью, согласно начального распределения, генерируются времена для каждой клетки популяции в отдельности. На рис. 10 можно посмотреть поведение клеток в фазах клеточного цикла для данной ситуации.

На рис. 11 изображены кинетические кривые для ситуации, когда половина клеток находится в фазе G1, а половина – в фазе S клеточного цикла.

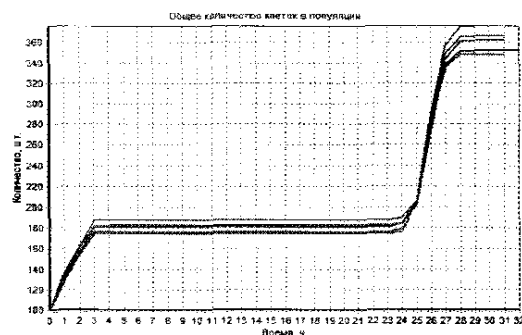


Рис. 7. Кинетические кривые для ситуации, когда все клетки находятся в фазе М клеточного цикла

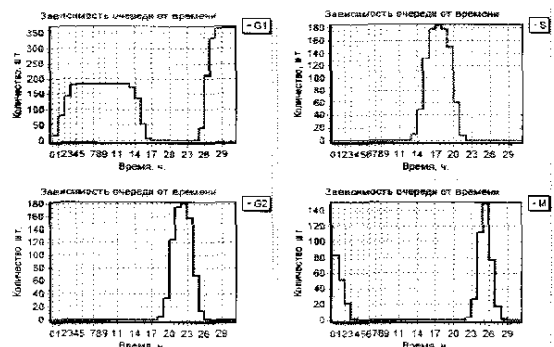


Рис. 8. Распределение клеток по фазам клеточного цикла для ситуации, когда все клетки находятся в фазе М

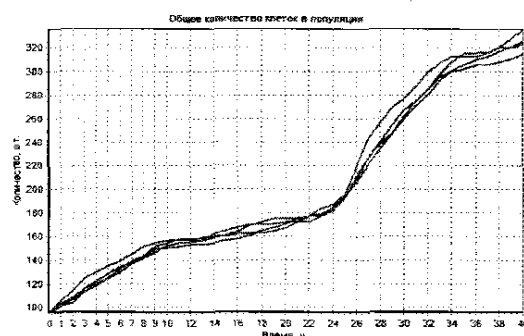


Рис. 9. Кинетические кривые ситуации, когда все клетки равномерно распределены по фазам клеточного цикла

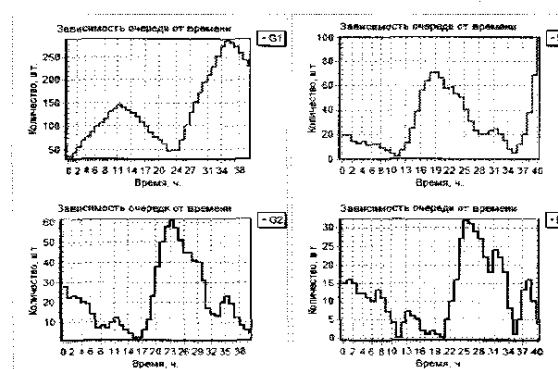


Рис. 10. Все клетки равномерно распределены по фазам клеточного цикла

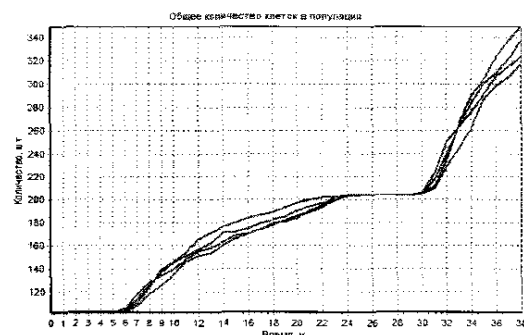


Рис. 11. Кинетические кривые для ситуации, когда половина клеток находится в фазе G1, а половина в фазе S клеточного цикла

Из рис. 11 видно, что кинетические кривые также существенно отличаются, и рост популяции начинается спустя 5 часов после начала исследования и продолжается 19 часов. Затем он останавливается на 6 часов и возобновляется снова. На рис. 12 изображено поведение клеток в фазах клеточного цикла для данного случая.

Одним из случаев, рассмотренных нами, была ситуация, когда половина клеток находится в фазе S, а половина – в фазе G1. Рост популяции начинается спустя 1 час, затем спустя 11 часов он приостанавливается на 15 часов и возобновляется снова (рис. 13).

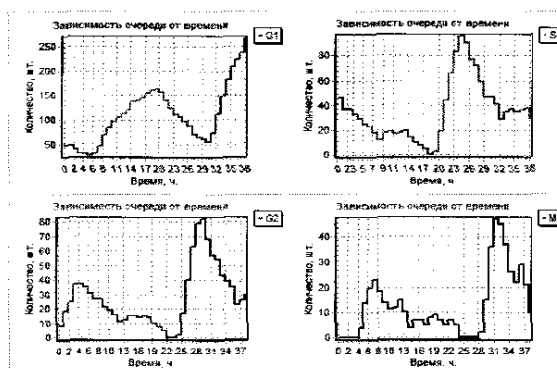


Рис. 12. Распределение клеток по фазам клеточного цикла для ситуации, когда половина клеток находится в фазе G1, а половина в фазе S

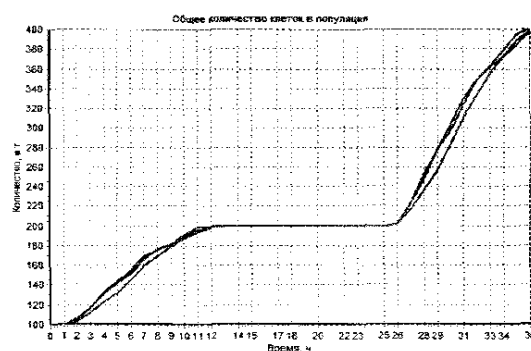


Рис. 13. Кинетические кривые для ситуации, когда половина клеток находится в фазе S, а половина в фазе G2 клеточного цикла

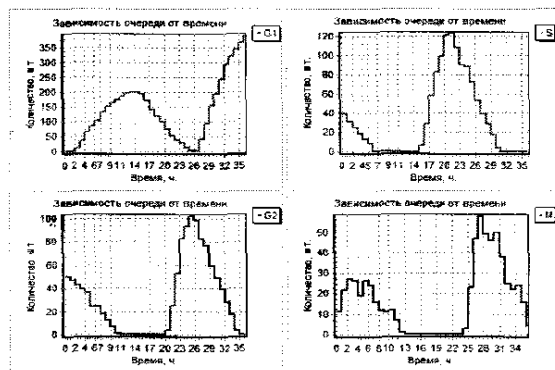


Рис. 14. Распределение клеток по фазам клеточного цикла для ситуации, когда половина клеток находится в фазе S, а половина в фазе G2

Поведение клеток в фазах клеточного цикла можно наблюдать на рис. 14.

Последняя, рассмотренная нами ситуация, – когда половина клеток находится в фазе G2, а половина – в фазе M клеточного цикла. На рис. 15 видно, что рост популяции начинается сразу после начала исследования, приостанавливается спустя 7 часов на 17 часов. В данном случае кинетические кривые расходятся не столь значительно, как в предыдущих случаях.

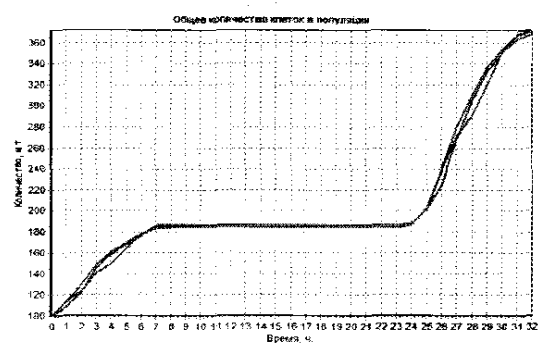


Рис. 15. Кинетические кривые для ситуации, когда половина клеток находится в фазе G2, а половина в фазе M клеточного цикла

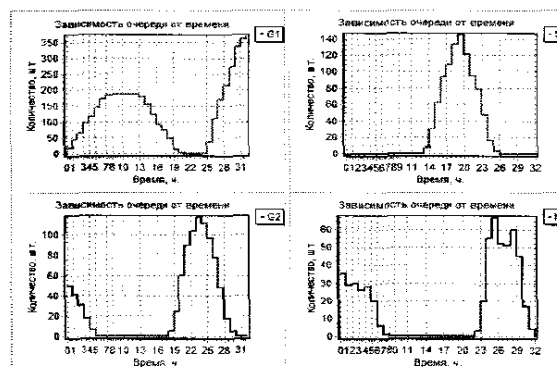


Рис. 16. Распределение клеток по фазам клеточного цикла для ситуации, когда половина клеток находится в фазе S, а половина в фазе G2

На рис. 16 изображена концентрация клеток в каждой фазе клеточного цикла на всем протяжении деления.

Поскольку целью данных экспериментов являлось наглядное определение влияния начального распределения клеток по фазам, то данные проводились в «идеальных условиях», а именно: в программе не учитывались, что некоторые клетки теряют способность к делению, смертность клеток и конечность питательного вещества.

Таким образом, в результате проведенных вычислительных экспериментов установлено, что начальное распределение клеток по фазам клеточного цикла существенно влияет на кинетику роста популяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамасцев А.А., Андреев А.А. О возможности использования различных моделей кинетики биосинтеза // Биофизика. 2001. Т. 46. Вып. 6. С. 1048-1061.
2. Арзамасцев А.А., Андреев А.А. Математическое моделирование и оптимизация процесса роста микробной популяции на основе фазовой гетерогенности клеточного цикла // Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки. Тамбов, 2002. Т. 7. Вып. 2. С. 303-307.
3. Андреев А.А. Моделирование фазовой гетерогенности роста микробных популяций // VII Державинские чтения: матер. науч. конф. преподавателей и аспирантов (Февр. 2002 г.). Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки. Тамбов, 2002. Т. 7. Вып. 1. С. 74.
4. Андреев А.А. Моделирование фазовой гетерогенности роста популяции эукариот // Математические методы в технике и технологиях: сб. трудов XV Междунар. науч. конф.: в 10 т. Т. 10. Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2002. С. 120-121.

Поступила в редакцию 23 июня 2006 г.