

УДК 51-7: 004.942

Хмельёв Алексей Павлович

Амурский государственный университет

г. Благовещенск, Россия

E-mail: lexysxeighn@gmail.com

Исюань Шуай

Амурский государственный университет

г. Благовещенск, Россия

E-mail: 706603568@qq.com

Масловская Анна Геннадьевна

Амурский государственный университет

г. Благовещенск, Россия

E-mail: maslovskayaag@mail.ru

A.P. Khmelev

Amur State University

Blagoveshensk, Russia

E-mail: lexysxeighn@gmail.com

Shuai Yixuan

Amur State University

Blagoveshensk, Russia

E-mail: 706603568@qq.com

Maslovskaya Anna Gennadievna

Amur State University

Blagoveshensk, Russia

E-mail: maslovskayaag@mail.ru

**КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ПОПУЛЯЦИИ
ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ВАРИАЦИИ РЕЖИМОВ
МНОГОКРАТНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ**

**SIMULATION OF POPULATION DYNAMICS
OF PATHOGENIC BACTERIA
UNDER VARIATION OF MULTIPLE INHIBITION REGIMES**

*Аннотация. В работе рассмотрена модификация математической модели динамики бактериальной популяции в условиях многократного ингибирования. Модель формулируется в постановке начальной задачи для обыкновенного дифференциального уравнения. Задача решена численно в ППП Matlab. Описаны результаты вычислительных экспериментов по расчету характеристик численности популяции вида *P. aeruginosa* при вариации режимов воздействия антимикробным препаратом.*

*Abstract. A mathematical model is considered to study a bacterial population dynamics under multiple inhibition action. The model is formulated as an initial problem for ordinary differential equation. The problem is solved numerically using Matlab software. The results of computational experiments on the calculation of the bacterial population characteristics of *P. aeruginosa* species under varying regimes of exposure to an antimicrobial agent are described.*

Ключевые слова: модель динамики популяций, бактериальное сообщество, дифференциальная модель роста популяции, ингибирование популяции, метод Рунге-Кутты, вычислительный эксперимент.

Key words: population dynamics model, bacterial community, differential model of population growth, population inhibition, Runge-Kutta method, computational experiment.

DOI: 10.22250/20730268_2022_97_20

Введение

В последние годы активное развитие в научном мире получили такие направления как математическая биология и *in silico*-исследования. Это обусловлено все возрастающей практикой применения математического моделирования и компьютерной имитации для решения жизненно важных задач в биологии и медицине. Особый интерес в этой отрасли научного знания представляет исследование коллективного поведения сообществ микроорганизмов, в том числе бактерий. В рамках данного подхода бактерия рассматривается как микроорганизм, способный за счет «чувства кворума» воспринимать присутствие других бактерий и контролировать численность популяции посредством выработки специальных сигнальных молекул [1-3]. Развиваемые математические и компьютерные модели охватывают широкий спектр методов и подходов, используя в качестве теоретического базиса аппарат дифференциальных уравнений различных видов, агентное моделирование, метод Монте Карло, клеточные автоматы, а также гибридные алгоритмы. Базовые обзоры представлены в [4-7], авторские исследования – в работах [8-12].

Важной составляющей многих теоретических концепций и вычислительных алгоритмов является задание законов динамики численности бактериального сообщества. Подобная формализация позволяет прогнозировать состояние бактериальных сообществ в естественных условиях, а также при неравновесном воздействии внешних факторов. Внимание многих ученых сфокусировано на исследовании тенденций к увеличению выработки факторов вирулентности патогенных бактерий и развитию свойств их резистентности по отношению к действию антибактериальных препаратов, в том числе к антибиотикам «нового поколения». Одной из важнейших подзадач в этой области является определение режима применения ингибиторов (антибиотиков или натуральных ферментов), действующих оптимально на бактериальные популяции с точки зрения используемой концентрации и производимых эффектов [13-16].

В настоящей работе в качестве объекта исследования рассмотрен бактериальный вид *Pseudomonas aeruginosa* (или синегнойная палочка). *Pseudomonas aeruginosa* – грамтрицательная анаэробная палочковидная бактерия семейства «псевдомонады», которая отличается резистентностью ко многим современным антимикробным препаратам [13]. Синегнойная палочка также относится к опасным бактериям – суперинфекторам, возникающим в стационаре у больных с диагностированным COVID-19 при применении аппаратов ИВЛ.

Цель настоящего исследования – развитие детерминированной математической модели динамики бактериального сообщества с учетом вариации режимов многократного ингибирования. Работа также ориентирована на проведение полного цикла вычислительного эксперимента по исследованию характеристик изменения численности популяции на примере бактериального вида *Pseudomonas aeruginosa*, подверженного многократной обработке с помощью антимикробного препарата.

Математическая постановка задачи моделирования

Для описания динамики изменения численности сообщества бактерий можно использовать законы популяционного роста, разработанные и применяемые для самых разнообразных живых систем. Некоторые из них позволяют моделировать динамику процесса и формализуются на основе

дифференциальных уравнений, другие представляют эмпирические аппроксимирующие зависимости, полученные путем алгебраических модификаций предшествующих представлений.

В серии авторских работ [12, 17] представлен сравнительный анализ моделей популяционной динамики, применимых для описания бактериальных сообществ, с использованием статистической обработки экспериментальных данных. Рассмотрены базовые модели и их поздние модификации: модель Ферхюльста (логистическая модель), модель Гомпертца, модификация логистической модели с заменой числа популяции на логарифм числа популяции, модификация модели Гомпертца с заменой числа популяции на логарифм числа популяции, модификация логистической модели с учетом коэффициента смертности, модификация модели Гомпертца с учетом коэффициента смертности, модификация логистической модели с заменой числа популяции на логарифм числа популяции и с учетом коэффициента смертности, модификация модели Гомпертца с заменой числа популяции на логарифм числа популяции и с учетом коэффициента смертности. Аппроксимация и статистический анализ были реализованы в ППП Matlab. Результаты вычислительных экспериментов для *Pseudomonas aeruginosa* на основе прямой аппроксимации данных эксперимента [18] позволили установить наиболее адекватную применимость логистической модели для этого бактериального вида.

Основу логистической модели, используемой в микробиологии [19], составляет задача Коши для обыкновенного дифференциального уравнения. Статистическая обработка экспериментальных данных, проведенная в [17], позволила также установить управляющие параметры дифференциальной модели.

Рассмотрим модификацию этой модели, учитывающую эффект запаздывания и многократное введение некоторой субстанции (например, антибиотика или натурального фермента), оказывающей ингибирующее воздействие на популяцию микроорганизмов:

$$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \left(1 - \frac{N(t-t')}{N_{\max}} \right) - \sum_{t_k \in T} \frac{v}{f(t)} \cdot N(t) \cdot H(t-t_k) \cdot A(t-t_k), \quad (1)$$

$$N(s) = N_0, \quad s \leq t_0, \quad (2)$$

где $N(t)$ – концентрация бактерий в момент времени t , мг/мл; t' – время запаздывания, час.; N_0 – концентрация бактерий в начальный момент времени, мг/мл; N_{\max} – максимально возможная численность популяции, мг/мл; r – величина, отвечающая за скорость роста популяции, 1/час; v – параметр, отвечающий за интенсивность ингибирования бактерий, мл/(мг·час); t_k – моменты времени введения ингибитора, час; $f(t)$ – неубывающая функция, моделирующая резистентность бактерий, 1; $A(t)$ – зависимость концентрации ингибитора от времени, мг/мл.

В настоящей работе временная зависимость концентрации ингибитора была аппроксимирована на основе эмпирического анализа данных экспериментальных наблюдений (см., например, [21]) с использованием распределения Рэлея:

$$A(t-t^*) = A_0(t-t^*) \exp\left(-\frac{(t-t^*)^2}{m}\right), \quad (3)$$

где A_0 и m – параметры аппроксимации, t^* – время введения ингибитора, час.

На рис. 1 представлен пример подобной аппроксимации (данные изменения концентрации антибиотика ципрофлоксацина). Антибиотик начинает действовать в момент времени $t^*=6$ час., максимальное значение $m=6.6 \exp(-0.5)$ мг/мл достигается спустя 4 час. от начала действия препарата, параметр $A_0=1.65$ мг/мл. Время релаксации составляет примерно 12 час., концентрация антибиотика при этом релаксирует к значению 0.2 мг/мл.

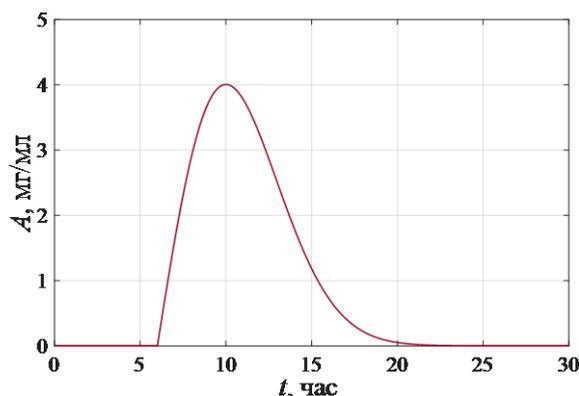


Рис. 1. Пример аппроксимации зависимости концентрации антибактериального препарата от времени.

Численный метод решения задачи

Задача в постановке (1) – (2) была решена численно на основе метода Рунге – Кутты IV порядка. Для построения набора приближенных значений N_i решения $N = N(t)$ задачи Коши (1) – (2) введем в рассмотрение сетку $t_i = t_0 + ih$, $i = \overline{1, n}$ с расчетным шагом $h = (t_{ob} - t_0)/n$, где t_{ob} – время наблюдения.

Метод Рунге – Кутты IV порядка для решения уравнения вида $N' = \varphi(t, N)$ включает следующую последовательность вычислений на каждом временном шаге:

$$\theta_1^i = \varphi(t_i, N_i), \quad \theta_2^i = \varphi\left(t_i + \frac{h}{2}, N_i + \frac{h}{2}\theta_1^i\right),$$

$$\theta_3^i = \varphi\left(t_i + \frac{h}{2}, N_i + \frac{h}{2}\theta_2^i\right), \quad \theta_4^i = \varphi(t_i + h, N_i + h\theta_3^i),$$

$$N_{i+1} = N_i + \frac{h}{6}(\theta_1^i + 2\theta_2^i + 2\theta_3^i + \theta_4^i). \quad (4)$$

Для верификации выбора шага h использована схема двойного пересчета. Реализация проведена в пакете прикладных программ Matlab.

Вычислительные эксперименты и анализ результатов

Проведем инициализацию параметров для компьютерного моделирования динамики популяций бактерий вида *P. aeruginosa*. Исследование логистической модели применительно к данному бактериальному виду на основе статистических методов позволило установить следующие значения параметров:

$$N_{max} = 0.8905653413047305 \text{ мг/мл},$$

$$N_0 = 7.979341423312693 \cdot 10^{-5} \text{ мг/мл},$$

$$r = 0.39156801297061045 \text{ 1/час}.$$

Время наблюдения процесса выберем $t_{ob} = 200$ час. Параметры аппроксимации изменения концентрации антибиотика соответствуют примеру, представленному на рис. 1.

Первый вычислительный эксперимент проведем, предполагая, что запаздыванием в биосистеме можно пренебречь: $t' = 0$. Проведем исследование изменения концентрации популяции бактерий в зависимости от скорости действия и времени введения антибиотика. Будем считать, что антибиотик добавлен в моменты времени: 40, 50, 60, 70 час. для каждого случая.

На рис. 2 представлены результаты вычислительных экспериментов при варьировании интенсивности действия ингибитора. Можно констатировать, что при недостаточной концентрации анти-

биотика ($v=0.1$ мл/(мг·час)) наблюдается некоторое снижение концентрации бактерий, дальнейшие колебания и восстановление численности популяции. Если же интенсивность действия антибиотика увеличить вдвое ($v=0.2$ мл/(мг·час)), то популяция будет уничтожена (в отсутствие стимулирующих жизнедеятельность условий). Однако в нашей модели заложен механизм непрерывного воспроизводства (логистического роста) популяции, а это означает, что при наличии питательной среды бактерии способны восстановить свою численность даже при интенсивном воздействии ингибитором (как, например, показано в случае $v=0.5$ мл/(мг·час)).

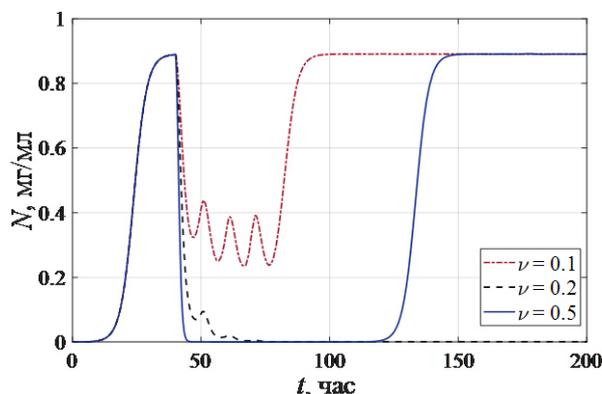


Рис. 2. Динамика изменения численности популяции бактерий *P. aeruginosa* при изменении скорости действия ингибитора.

Можно заключить, что механизмы ингибирующего действия в модели (1) – (2) позволяют адекватно воспроизводить экспериментально наблюдаемые закономерности: неоднократное применение быстродействующих антибиотиков приводят к деградации бактериальной популяции.

В рамках следующего вычислительного эксперимента рассмотрим четыре варианта задания функциональной зависимости резистентности бактериальной популяции. Будем считать, что во всех случаях она возрастает с течением времени: $f_1(t) = f_{01}\sqrt{t}$ (sqrt), $f_2(t) = f_{02}t$ (linear), $f_3(t) = f_{03}t^2$ (quadratic), $f_4(t) = f_{04}\exp(t)$, где совокупность констант обеспечивает согласование размерностей (в эксперименте положены равными единичным значениям). Будем считать, что антибиотик введен трижды – в моменты времени 30, 40 и 50 час. На рис. 3 представлены результаты вычислительных экспериментов как изменение концентрации популяции бактерий вида *P. aeruginosa* в зависимости от интенсивности действия антибиотика и при варьировании сценариев резистентности.

Отметим, что для низкой интенсивности действия антибактериального препарата ($v=0.1$ мл/(мг·час)) при любом уровне резистентности мы получим восстановление численности популяции и ее релаксацию к постоянному уровню спустя 40 час. от начала введения первой дозы антибиотика. В присутствии резистентности бактерий при удвоенной интенсивности антибиотика $v=0.2$ мл/(мг·час) мы не сможем добиться гибели популяции. Интенсифицированная доза, определенная значением коэффициента $v=0.3$ мл/(мг·час), уже способна приводить к деградации колонии патогенных бактерий, однако они в этом случае либо обладают «сдержанной» резистентностью, либо не обладают ей вообще. Тройная обработка антибиотиком повышенной дозы ($v=0.4$ мл/(мг·час)) позволит «выжить» популяции, только если она обладает очень высокой степенью резистентности, обеспеченной экспоненциальной зависимостью от времени функции $f(t)$.

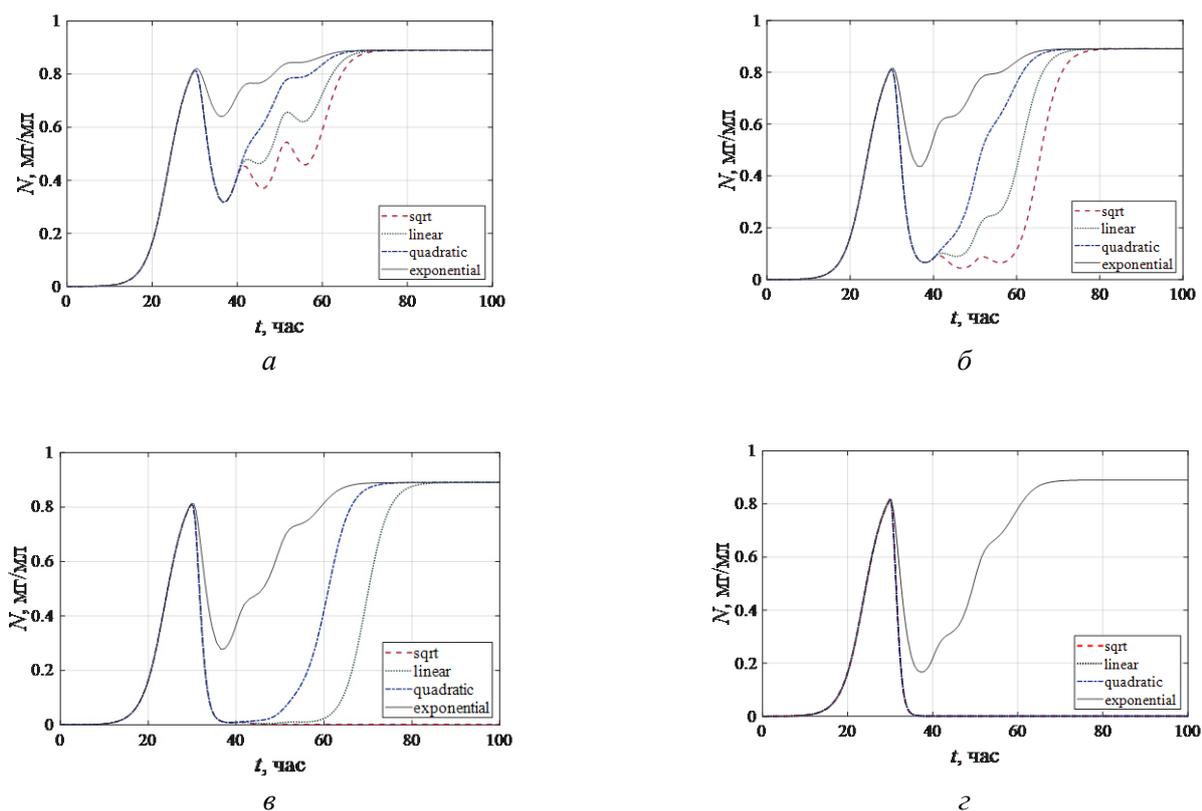


Рис. 3. Динамика бактериальной концентрации при изменении интенсивности ингибитора и варьировании стратегий резистентности: $v=0.1$ мл/(мг·час) – (а), $v=0.2$ мл/(мг·час) – (б), $v=0.3$ мл/(мг·час) – (в), $v=0.4$ мл/(мг·час) – (г).

Последний аспект исследования сфокусируем на реализации математической модели с запаздыванием по времени. Аналогично модели популяционной динамики Хатчинсона положим, что концентрация бактерий изменяется не мгновенно, а с некоторым временным лагом. Определим предысторию процесса заданием начальных значений концентрации. На рисунке 4 приведены результаты расчетов при варьировании временного лага: $t' = 0, 0.5, 1, 2$ час. Время введения антибиотика установим аналогично предыдущему случаю. Функциональную зависимость резистентности бактериальной популяции примем линейной.

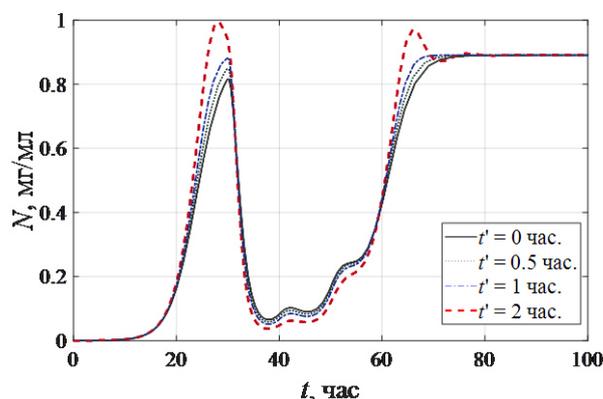


Рис. 4. Динамика бактериальной концентрации при варьировании времени запаздывания.

Как показывает вычислительный эксперимент, присутствие запаздывания, которое может наблюдаться в реальных биосистемах (как правило, для бактериальных колоний время запаздывания составляет до 1 часа), не оказывает существенного влияния на характер динамики концентрации бак-

терий, в том числе при многофазной антибактериальной обработке. Только завышенное значение временного лага (2 и более час.), позволяет выявить существенные эффекты в поведении исследуемой характеристики, которые выражены в возникновении флуктуаций и увеличении максимального значения концентрации биомассы.

Заключение

Таким образом, в рамках настоящей работы представлена модификация классической логистической модели динамики популяций бактерий с запаздыванием, предполагающая введение многофазной деградации этой популяции за счет действия ингибитора.

Проведенные *in silico* исследования показывают, что механизмы ингибирующего действия позволяют адекватно воспроизводить экспериментально наблюдаемые закономерности: неоднократное применение интенсивных антибиотиков приводит к деградации популяции патогенных бактерий. В тех случаях, когда формируется свойство резистентности (усиление «выживаемости» микроорганизмов при многофазном антибактериальном воздействии), требуется применение более чем трехкратной обработки или использование интенсифицированных доз антибиотика. При этом учет временного лага существенно не влияет на характер динамики концентрации бактерии и, следовательно, на выбор стратегии антибактериальной обработки. Данные результаты востребованы в более сложных моделях [8-10], описывающих «чувство кворума» патогенных бактериальных видов.

Перспективным направлением развития данной работы является анализ поведения характеристик модели в случае «обучаемости» – изменения характера резистентности бактериальной колонии с учетом ее пространственно-временной динамики. Математическая формализация детерминированной модели при этом потребует использования аппарата дифференциальных уравнений с частными производными.

1. Miller, M.B., Bassler, B.L. Quorum sensing in bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2001. – V. 55. – P. 165 – 199.
2. Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., Salmond, G.P.C. Quorum sensing in Gram-negative bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2001. – V. 25. – P. 365 – 404.
3. Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., Camara, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world // *Philosophical Transactions of the Royal Society.* – 2007. – V. 362(1). – P. 1119 – 1134.
4. Ward, J.P., King, J.R., Koerber, A.J., Williams, P., Croft, J.M., Sockett, R.E. Mathematical modelling of quorum sensing in bacteria // *Math. Med. Biol.* – 2001. – V. 18. – P. 263 – 292.
5. Perez-Velazquez, J., Gölgeci, M., Garcia-Contreras, R. Mathematical modelling of bacterial quorum sensing: a review // *Bull. Math. Biol.* – 2016. – V. 76. – P. 1585 – 1639.
6. Goryachev, A.B. Understanding bacterial cell-cell communication with computational modeling // *Chem. Rev.* – 2011. – V. 111. – P. 238 – 250.
7. Müller, J., Kuttler, C., Hense, B.A., Rothballer, M., Hartmann, A. Cell-cell communication by quorum sensing and dimension-reduction // *J. Math. Biol.* – 2006. – V. 53. – P. 672 – 702.
8. Kuttler, C., Maslovskaya, A. Wave effects in stochastic time lagging reaction-diffusion model of quorum-sensing in bacterial populations // *Proc. of the IEEE, “Days on Diffraction”.* – 2020. – P. 62 – 67.
9. Kuttler, C., Maslovskaya, A. Hybrid stochastic fractional-based approach to modeling bacterial quorum sensing // *Applied Mathematical Modelling.* – 2021. – V. 93. – P. 360 – 375.
10. Kuttler, C., Maslovskaya, A., Moroz, L. Numerical simulation of time-fractional diffusion-wave processes applied to communication in bacterial populations // *Proc. of the IEEE, “Days on Diffraction”.* – 2021. – P. 114 – 119.
11. Юшкевич, П.А., Коршик, Д.А., Масловская, А.Г. Численное моделирование реакционно-диффузионных процессов в задаче исследования коллективного поведения микроорганизмов // *Вестник АмГУ. Серия «Математика. Прикладная математика».* – Благовещенск: АмГУ, 2019. – Вып. 87. – С. 3 – 7.
12. Шуай, И., Хмелёв, А.П., Масловская, А.Г. Реакционно-диффузионная модель коммуникации бактерий с учетом вариации закона популяционного роста // *Вестник АмГУ, серия «Естественные и экономические науки».* – 2021. – Вып. 93. – С. 14 – 23.
13. Soares, A., Roussel, V., Pestel-Caron, M., Barreau, M., Caron, F., Bouffartigues, E., Chevalier, S., Etienne, M. Understanding ciprofloxacin failure in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: persister cells survive matrix disruption // *Front. Microbiol.* – 2019. – V. 10. – P. 2603 (10).

14. Roberts, P.A., Huebinger, R.M., Keen, E., Krachler, A.-M., Jabbari, S. Mathematical model predicts anti-adhesion antibiotic debridement combination therapies can clear an antibiotic resistant infection // PLoS Comput. Biol. – 2019. – V. 15, № 7. – P. e1007211(39).
15. Paterson, I., Hoyle, A., Ochoa, G. et al. Optimising antibiotic usage to treat bacterial infections // Sci Rep. – 2016. – V. 6. – P. 37853 (10).
16. Kuttler, C., Maslovskaya, A. Computer simulation of communication in bacterial populations under external impact of signal-degrading enzymes // Proc. of the CEUR “Workshop Proceedings”. – 2020. – V. 2783. – P. 163 – 179.
17. Хмельёв А.П., Масловская А.Г. Статистическая обработка данных моделирования популяционной динамики бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa* // Материалы научно-практической конференции «ТОГУ – Старт-2021: фундаментальные и прикладные исследования молодых». – Хабаровск, 2021. – С. 177 – 184.
18. Ditmarsch, D., Xavier, J.B. High-resolution time series of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression and rhamnolipid secretion through growth curve synchronization // BMC Microbiology. – 2011. – V. 11. – Article number 140 (10).
19. Eridani, W., Purwati, U.D. A new modified logistic growth model for empirical use // Communication in Biomathematical Sciences. – 2018. – V. 1. – Issue 2. – P. 122 – 131.
20. Хмельёв, А.П., Масловская, А.Г. Модельное представление динамики численности сообщества бактерий в условиях многократного ингибирования // Сборник материалов IX Международной научной конференции, посвященной 85-летию профессора В.И. Потапова, – Омск, 2021. – С. 89 – 91.
21. Rakhmawatie, D.D., Mustofa, M., Sholikhah, E.N. Effects of ciprofloxacin concentrations on the resistance of uropathogen *Escherichia coli*: *in vitro* kinetics and dynamics simulation model // J. Med Sci. – 2020. – V. 52. – P. 191 – 204.