

Применение минимальных математических моделей динамики сигнального пути p53 — микроРНК к анализу лабораторных данных

С. Д. СЕНОТРУСОВА, О. Ф. ВОРОПАЕВА*, Ю. И. ШОКИН

Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, 630090, Новосибирск, Россия

*Контактный автор: Воропаева Ольга Фалалеевна, e-mail: vorop@ict.nsc.ru

Поступила 2 ноября 2020 г., доработана 9 ноября 2020 г., принята в печать 16 ноября 2020 г.

Работа посвящена практическому использованию минимальных математических моделей динамики сигнального пути p53 для описания достаточно широкого круга лабораторных экспериментов, в которых взаимодействие p53 и белков-ингибиторов p53 опосредуется микроРНК, образующими с p53 петлю положительной обратной связи. Представлены базовая модель, разработанные на ее основе новые минимальные модели, алгоритм численного решения прямых и обратных коэффициентных задач и результаты сопоставления полученных численных решений с экспериментальными данными о динамике уровней белков p53, p21, Вак, белков-ингибиторов Mdm2, Wip1, Sirt1 и различных микроРНК (miR-16, miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215) в условиях стрессовых воздействий. С привлечением полученных математических моделей исследованы базовые механизмы функционирования сигнального пути p53 в условиях, приближенных к условиям конкретных лабораторных экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Продемонстрированы синергический эффект гиперактивации сигнального пути p53, в котором задействованы микроРНК, и механизмы бимодального переключения. Показана ключевая роль p53-зависимых микроРНК в реализации некоторых гипотетических терапевтических стратегий, связанных с управлением механизмом активации апоптоза клеток. В рамках принятой базовой модели даны оценки вероятности рассогласования в диагностике дегенеративных заболеваний, основанной на анализе уровня p53-зависимых микроРНК и p53, при слабой и умеренной дерегуляции микроРНК.

Ключевые слова: математическая модель, численный анализ, обратная коэффициентная задача, p53, положительная обратная связь, p21, Вак, Mdm2, Wip1, Sirt1, miR-16, miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215, синергический эффект, бимодальный переключатель, дерегуляция микроРНК.

Цитирование: Сенотрусова С.Д., Воропаева О.Ф., Шокин Ю.И. Применение минимальных математических моделей динамики сигнального пути p53 — микроРНК к анализу лабораторных данных. Вычислительные технологии. 2020; 25(6):4–49. DOI:10.25743/ICT.2020.25.6.002.

Введение

Белок p53 широко известен как важный подавитель опухолевого процесса и онкомаркер [1–7]. Среди множества известных функций p53 одной из главных признается его

способность препятствовать размножению клеток с дефектами ДНК через запуск программ регуляции клеточного цикла, старения и апоптоза (естественного процесса самоуничтожения поврежденных или старых клеток) [1, 2]. Сбой в функционировании p53 может привести к развитию наиболее опасных дегенеративных заболеваний, характеризующихся чрезмерным накоплением в организме дефектных, в том числе раковых, клеток или, наоборот, массовой гибелью клеток, обеспечивающих нормальное функционирование головного мозга, сердечной мышцы, печени и других жизненно важных органов [2].

Управление реакцией p53 на повреждение ДНК осуществляется через сложную систему положительных и отрицательных прямых и обратных связей p53 с белками Mdm2, Sirt1, Wip1, p21, Bax (этот список далеко не полон), а также с многочисленными семействами микроРНК (miR) [1–12]. Большой интерес вызывают петли положительной обратной связи p53 с микроРНК, действующими через белки-ингибиторы p53. Среди них, в частности, наиболее изученные семейства miR-16 [11, 12], miR-34 [13–15], miR-143/145 [16], miR-192, miR-194 и miR-215 [17], miR-221 [10, 18]: все они находятся в положительной зависимости от p53 и одновременно подавляют активность какого-либо белка-ингибитора p53. Известно, что системы подобного рода, кроме обычного режима функционирования, могут обладать способностью к синергии, результатом которой является сверхактивация сигнального пути p53. Поэтому синергический эффект представляет интерес и как один из ключевых механизмов функционирования системы, влияющих на определение судьбы клетки, и как инструмент для массового запуска программы клеточной смерти при некоторых таргетных терапевтических воздействиях на раковые клетки [19–23].

Известно, что нарушения функций p53 и белков-ингибиторов могут быть обнаружены *in vitro* и *in vivo* инструментально и выражены количественно: в клетках большинства форм рака уровни белков-ингибиторов p53, функционирующих как онкогены, оказываются патологически завышенными, а уровни p53, наоборот, сниженными. Напротив, при фиброзе печени и легких, ишемических повреждениях разных органов и большинстве нейродегенеративных заболеваний в поврежденных клетках отмечаются слишком высокие уровни и/или гиперактивация p53. В последние годы во многих биомедицинских исследованиях было замечено, что p53-зависимые микроРНК ведут себя как p53 или, наоборот, как белки-ингибиторы p53 в зависимости от характера связи с p53. Поэтому p53, его ингибиторы Mdm2, Sirt1, Wip1 и особенно связанные с ними микроРНК все чаще рассматриваются в качестве терапевтических мишеней при дегенеративных заболеваниях, сопровождающихся дисбалансом процессов размножения и гибели клеток, накоплением в клетках патологических изменений, при которых происходит непрерывное ухудшение структуры и функционирования органов и тканей. Следует отметить, что конкретные механизмы воздействия на сигнальный путь p53 и его мишени, обеспечивающие терапевтическую реакцию p53, находятся в настоящее время в стадии активного изучения как в рамках биомедицинских лабораторных исследований, так и с привлечением математических моделей.

Достаточно подробные обзоры минимальных математических моделей, предназначенных для описания наиболее общих закономерностей функционирования сигнального пути p53, в том числе с учетом p53-зависимых микроРНК, можно найти, в частности, в [24–29] и цитируемой там литературе. Общим местом этих и ряда других обзоров является признание того, что в математическом моделировании динамики сигнального пути p53 доминирует подход, основанный на анализе качественных свойств решений

систем дифференциальных уравнений. Благодаря этому был выдвинут ряд интересных гипотез о функционировании данной биологической системы и с формальных позиций объяснены некоторые экспериментальные факты. Наиболее ярким примером является гипотеза о бимодальном переключении динамических режимов функционирования сети р53 в условиях стресса, которая не только отражает наблюдаемое изменение в динамике р53 в зависимости от уровня стрессового воздействия (повреждения ДНК), но и стала своего рода фундаментальным фактом, на котором проходят проверку адекватности многие современные математические модели (см., например, [30]).

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в рамках “качественного” подхода, математические модели, выходящие за его рамки благодаря детальному количественному согласованию с экспериментальными данными, имеют существенно более высокий потенциал, обеспечивая повышенный уровень доверия к результатам теоретического анализа и попыткам на его основе всесторонне охарактеризовать динамику р53 в норме и патологии. Очевидно, что первым шагом для перехода на этот уровень математического моделирования может стать создание моделей, в основе которых лежит тот же уровень биологической идеализации, что и в описываемых лабораторных моделях. Результаты многочисленных лабораторных исследований свидетельствуют о том, что р53, его регуляторы и регулируемые им гены формируют крайне сложную и запутанную сигнальную сеть. Поэтому в настоящее время лабораторные и клинические исследования, сосредоточенные на анализе связей, выявлении наиболее общих закономерностей и особенностей функционирования этой биологической системы, как правило, предполагают количественные измерения для систем типа белок — белок-ингибитор, мРНК — белок — белок-ингибитор, сигнал — белок — белок-ингибитор, белок — белок-ингибитор — микроРНК. Этому подходу в наибольшей степени соответствуют именно минимальные (малоразмерные) математические модели, в том числе модели достаточно общего вида.

Важным для настоящей работы примером минимальной модели является модель, предложенная в [31] для описания динамики систем с отрицательной обратной связью, в том числе для системы р53 — Mdm2 (там же можно найти аналитическое стационарное решение и некоторые результаты теоретического анализа устойчивости), и подробно изученная в [25, 32, 33]. Ядро модели составляет относительно редко используемая в практике моделирования кинетическая функция Гольдбетера — Кошланда [34]. В [34, 35] отмечается, что функция Гольдбетера — Кошланда, хотя и подобна “переключателю”, в то же время сходна с линейными и гиперболическими функциями по ряду свойств. Последнее, как будет показано ниже, имеет крайне важное значение с точки зрения управления взаимосвязью белок — ингибитор или белок — микроРНК, в которой, согласно наблюдениям, отклик должен постоянно увеличиваться с ростом мощности входного сигнала, причем небольшое усиление сигнала должно вызывать соответствующий воздействию ответ. Минимальная модель [31] включает только два дифференциальных уравнения (одно из них с запаздыванием), которые представляют собой соотношения баланса, отражающие изменение уровней белков р53 и Mdm2 под влиянием трех механизмов — спонтанной генерации и деградации как конститутивного процесса и как результата множества неучтенных в модели процессов, а также взаимодействий белок — белок и ДНК — белок. Авторы модели [31] дают достаточно ясную биологическую интерпретацию принятых аппроксимаций механизма взаимодействия: комплексы, составленные из связанных с Mdm2 молекул р53, вызывают деградацию р53 (по пути убиквитинирования) с посто-

янной скоростью, скорость генерации Mdm2 пропорциональна вероятности создания комплексов p53 — Mdm2-ген, в которых могут участвовать только свободные молекулы p53.

В настоящей работе модель [31] и подход, основанный на кинетике Гольдбетера — Кошланда и Михаэлиса — Ментен с запаздыванием, используются для разработки новых математических моделей достаточно общего вида и выполнения цикла исследований динамики p53-зависимых микроРНК. Основные результаты предыдущих исследований, представленные в [25–27, 33], сводятся к следующему. Разработана иерархия минимальных математических моделей функционирования сети p53 — ингибитор — микроРНК с положительным прямым и обратным вариантами связи p53 — микроРНК [25, 27]. Численный анализ решений моделей показал наличие особых динамических режимов — бифуркаций рождения предельных циклов и торообразных фазовых траекторий в биологически адекватном диапазоне параметров моделей [26], которые могут служить иллюстрацией сложной динамики реальной биологической системы. Исследованы некоторые важные для практики приближенных вычислений вопросы сходимости решения системы с запаздыванием к решению системы ОДУ высокой размерности, и наоборот, детально проанализированы основные источники погрешностей, выполнен асимптотический анализ предельного перехода, численно показано наличие условия курантовского типа, гарантирующего устойчивость предельного перехода [33]. Выполнен основанный на сопоставлении с экспериментальными данными комплекс численных экспериментов, иллюстрирующих адекватность принятого подхода и очерчивающих область его применимости. Это позволило использовать принятые минимальные модели для проведения обобщенной (в рамках принятых биологических идеализаций механизмов функционирования системы) оценки диагностического и терапевтического потенциала p53-зависимых микроРНК при онкологических и нейродегенеративных заболеваниях [25], а также продемонстрировать [26] синергический эффект гиперактивации сразу двух регуляторов апоптоза — p53 и микроРНК, который ранее был замечен в ряде лабораторных экспериментов и представляет большой интерес как один из вариантов повышения эффективности противораковой терапии и как одно из фундаментальных общих свойств сложных систем.

Настоящая работа посвящена практическому использованию принятого подхода для количественного описания достаточно широкого круга лабораторных экспериментов, в которых взаимодействие p53 и белков-ингибиторов p53 опосредуется микроРНК, образующими с p53 петлю положительной обратной связи. Представлены новые минимальные модели, алгоритм численного решения прямых и обратных коэффициентных задач и результаты сопоставления полученных численных решений с экспериментальными данными о совместной динамике уровней p53, его белков-ингибиторов Mdm2, Wip1, Sirt1 и различных miR (miR-16, miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215). С привлечением полученных математических моделей продемонстрированы основные механизмы и особые режимы функционирования сигнального пути p53 в условиях, приближенных к условиям конкретных лабораторных экспериментов *in vitro* и *in vivo*, и показана ключевая роль p53-зависимых микроРНК в реализации некоторых гипотетических терапевтических стратегий, связанных с управлением механизмом активации апоптоза клеток. В рамках принятого подхода даны оценки вероятности расхождения результатов диагностики заболевания, основанной на анализе белка p53, с диагностикой на основе p53-зависимых микроРНК при слабой и умеренной дерегуляции микроРНК.

1. Базовая математическая модель

Модель 1 (базовая). Для описания взаимосвязи р53 — ингибитор — микроРНК привлекается нелинейная система дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами [26, 27]. Эта минимальная модель составлена из балансных соотношений, отражающих вклад в совместную динамику системы р53 — ингибитор — микроРНК механизмов спонтанной генерации и деградации (в рамках модели эти термины подразумевают как конститутивные, так и неучтенные явно процессы), а также особо выделяется взаимное влияние элементов системы — р53-зависимая активация/генерация белка-ингибитора и микроРНК, инактивация/деградация р53 под влиянием белка-ингибитора и микроРНК-зависимое подавление генерации белка-ингибитора р53. Модель имеет следующий вид:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (1)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t) - b_3 f(y_2(t - \tau_3), y_3(t - \tau_3), k_m), \quad (2)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t). \quad (3)$$

Здесь и ниже, если не оговорено иное, y_1, y_2, y_3 — уровни р53, белка-ингибитора (отрицательного регулятора р53) и микроРНК соответственно; a_1 и c_1 — константы скорости генерации белка р53 и микроРНК; a_2 — константа скорости деградации р53 под влиянием ингибитора; a_3, b_2, c_3 — константы скорости деградации р53, ингибитора и микроРНК; b_1 и c_2 — константы скорости р53-зависимой генерации ингибитора и микроРНК; b_3 — константа скорости микроРНК-зависимого подавления генерации белка-ингибитора; параметрам k_f, k_g, k_p и k_m в рамках принятой модели отводится роль регуляторов, обеспечивающих “тонкую настройку” уровней взаимосвязи участников сети; параметры τ_1, τ_2 и τ_3 определяют время запаздывания реакции на сигналы в молекулярной сети. Общая схема рассматриваемого в работе сегмента сигнального пути р53 — микроРНК с учетом внешних воздействий представлена на рис. 1.

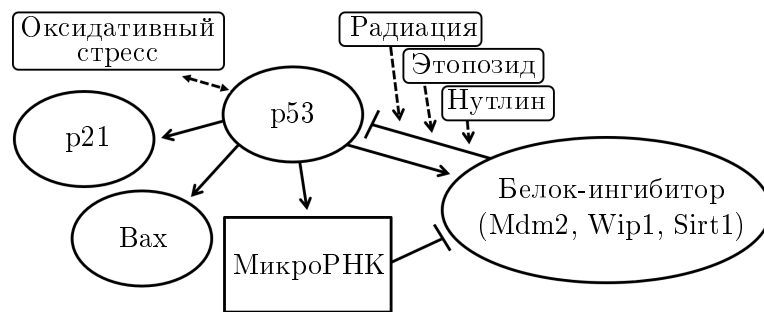


Рис. 1. Схема биологических взаимосвязей сигнального пути белка р53. Заостренные стрелки указывают на наличие положительного воздействия, тупые — отрицательного; сплошными линиями обозначены взаимодействия внутри системы, штриховыми — внешние воздействия
 Fig. 1. Scheme of biological relationships of the p53 protein signaling pathway. Pointed arrows indicate the presence of a positive impact, blunt arrows indicate a negative one; solid lines indicate interactions within the system, dashed lines indicate external influences

В уравнениях (1)–(3) и всюду ниже в качестве основных представлений функций взаимодействия использовались аппроксимации типа Гольдбетера — Кошланда и Михаэлиса — Ментен:

$$f(x_1, x_2, p_f) = \frac{1}{2} \left(x_1 + x_2 + p_f - \sqrt{(x_1 + x_2 + p_f)^2 - 4x_1x_2} \right),$$

$$g(x_1, x_2, p_g, p_f) = \frac{x_1 - f(x_1, x_2, p_f)}{x_1 + p_g - f(x_1, x_2, p_f)}.$$

Начальные данные для системы (1)–(3) задаются в виде так называемых функций истории [36]: $y_q(\theta) = \varphi_q(\theta)$, $\theta \in [-\tau, 0]$, где $q = 1, 2, 3$, $\tau = \max(\tau_1, \tau_2, \tau_3)$. Численные эксперименты показали, что влияние начальных данных на численное решение модели (1)–(3) проявляется лишь на относительно небольших интервалах времени, поэтому начальные условия задавались функциями, тождественно равными нулю. Зависимость численного решения модели 1 от параметров запаздывания, а также особенности фазовых портретов детально исследовались в [26, 27].

Обезразмеривание. Математическая модель 1 будет применяться в дальнейшем как базовая при создании более частных моделей динамики сигнального пути р53, предназначенных для описания конкретных условий достаточно широкого круга лабораторных экспериментов. Принимая во внимание существенную разномасштабность моделируемых явлений и различия в единицах измерений, удобно произвести обезразмеривание полученных систем уравнений с использованием следующих представлений переменных задачи: $t = Tt^*$, $y_q = C_q y_q^*$, где T — масштаб времени, C_q — характерные масштабы уровней белков и микроРНК ($q = 1, \dots, n$); * — знак обезразмеривания. Тогда вид обезразмеренных систем будет совпадать с их видом до обезразмеривания.

Конкретный выбор значений масштаба времени T определяется условиями каждого рассматриваемого лабораторного эксперимента и может варьироваться от нескольких секунд до нескольких дней или недель. Одновременно с этим для удобства интерпретации результатов моделирования и оценки характерных состояний моделируемой биологической системы масштабы изменения уровней белков и микроРНК C_q во всех случаях целесообразно связать с одной серией в достаточной мере универсальных лабораторных измерений. В этом качестве, как и во всех предыдущих работах (см., например, [26]), используются результаты цикла лабораторных исследований [5] (к ним привязаны, в частности, значения параметров в таблицах и фазовые портреты решений). Это, помимо прочего, дает возможность рассматривать решения, соответствующие разным лабораторным экспериментам, с общих позиций. Ниже, если это не оговорено особо, будем иметь дело с обезразмеренными уравнениями и переменными, при этом знак обезразмеривания * будет опускаться. Ориентируясь на результаты анализа лабораторных данных [5] и общих представлений о совместной динамике белков и микроРНК, как и в предыдущих работах, принимаем базальный набор (обезразмеренных) параметров модели 1:

$$\begin{aligned} a_1^0 &= 1, & a_2^0 &= 3 \cdot 10^{-2}, & a_3^0 &= 10^{-4}, & c_1^0 &= 65, & c_2^0 &= 1.2, & c_3^0 &= 1.1, \\ b_1^0 &= 1.005, & b_2^0 &= 8.9 \cdot 10^{-2}, & b_3^0 &= 6 \cdot 10^{-4}, \\ k_f^0 &= 180, & k_g^0 &= 28, & k_m^0 &= 10, & k_p^0 &= 50.4. \end{aligned} \tag{4}$$

Этот набор параметров будет привлекаться исключительно в методических целях.

В дальнейшем следует иметь также в виду, что для корректного сравнения результатов лабораторного и математического моделирования в соответствии с общепринятой практикой обработки биомедицинских данных дополнительно производилась нормировка полученных численных решений, согласованная с представлением экспериментальных данных в соответствующих работах. Для краткости на графиках уровни белков и микроРНК будут обозначаться их биологическими названиями, написанными курсивом, например *p53*, *Mdm2*, *miR-16*.

2. Численный алгоритм

Представленные в настоящей работе математические модели предполагают численное решение прямых и обратных коэффициентных задач для нелинейных систем функционально-дифференциальных уравнений.

Прямая задача. Численное решение прямой задачи осуществляется с использованием конечно-разностных схем типа предиктор-корректор и идеи метода Зейделя. Пусть рассматривается задача с начальным условием для системы дифференциальных уравнений с запаздыванием следующего общего вида, где $\mathbf{P} = (p_1, \dots, p_M)$ — набор параметров модели:

$$\frac{d\mathbf{y}}{dt} = \mathbf{F}(t, \mathbf{y}(t), \mathbf{y}(t - \tau), \mathbf{P}), \quad \mathbf{y}(\theta) = \mathbf{\Psi}(\theta), \quad t_0 - \tau \leq \theta \leq t_0. \quad (5)$$

В основе алгоритма решения задачи вида (5) лежит метод последовательного интегрирования (метод шагов), в рамках которого решение осуществляется поэтапно на интервалах времени, равных величине запаздывания τ , так что функции с запаздывающим аргументом известны из начального условия или из приближенного решения, полученного на предыдущем интервале времени. Тем самым задача (5) сводится к последовательному решению задачи Коши. Этот подход, принятый для теоретических исследований, позволяет не только отказаться от специальных численных методов, ориентированных на решение дифференциальных уравнений с запаздыванием, в пользу широко известных численных методов решения задачи Коши, но и способствует более эффективной организации компьютерных вычислений. При этом следует иметь в виду известный теоретический факт [36]: несмотря на возможное существование у функций \mathbf{F} и $\mathbf{\Psi}$ непрерывных производных сколь угодно высокого порядка, решение начальной задачи, в общем случае, будет иметь разрыв первого рода у производной порядка l в точке $t_0 + (l - 1)\tau$, но производные более низких порядков в этой точке будут уже непрерывны. В численных расчетах, как правило, это влечет за собой потерю порядка точности решений, полученных методами относительно высокого порядка. Однако при выборе численного метода решения прямой задачи основным критерием оптимальности метода и значений сеточных параметров будем считать удачное сочетание достаточной точности и экономичности (последнее особенно важно при решении обратной коэффициентной задачи).

В численных экспериментах с применением системы (1)–(4) достаточно высокую точность показали, в частности, метод Адамса — Бэшфорда — Моултона (АБМ) четвертого порядка точности и предиктор-корректор второго порядка, в котором роль предиктора выполняет явный метод Эйлера, а роль корректора — улучшенный метод Эйлера. По результатам методических расчетов для решения задачи Коши применялся, как правило, метод предиктор-корректор второго порядка на сетке с разрешением

100–10000 точек на единицу характерного времени моделируемого процесса. Следует отметить, что в некоторых сериях расчетов для дополнительной проверки адекватности решений систем с (умеренной) жесткостью привлекались также методы АБМ и Гира четвертого порядка на достаточно мелкой сетке. Для исключения потерь точности, связанных с вычислением (интерполяцией) значений функций с запаздывающими аргументами в узлах расчетной сетки, и из соображений простоты численной реализации шаг по времени h выбирался таким образом, чтобы значения параметров запаздывания были кратными h .

Обратная коэффициентная задача. При математическом моделировании динамики сигнального пути р53 в условиях, приближенных к условиям лабораторных экспериментов, как правило, требуется адаптировать к ним базовую модель, а затем решить обратную коэффициентную задачу. Для решения последней используется оптимизационный подход. Определение оптимального набора параметров модели осуществляется с применением стохастического генетического алгоритма ВГА. Ранее ВГА применялся авторами при построении математических моделей биохимических процессов при инфаркте миокарда и раневом повреждении. Подробное описание метода и анализ его эффективности, основанный на сопоставлении с методами оптимизации других классов, можно найти в [37]. Поэтому перечислим здесь лишь наиболее важные для практики расчетов аспекты его использования.

Пусть p_1, \dots, p_μ — набор параметров модели, подлежащих определению, где $\mu \leq M$. В рамках ВГА осуществляется итерационный процесс формирования и оценки N_{gen} поколений, каждое из которых включает в себя достаточно большое число z индивидуумов π_1, \dots, π_z , где $\pi_l = (p_1, \dots, p_\mu)$ — набор значений параметров модели; $l = 1, \dots, z$. Нулевое поколение численностью $z = z_0$ формируется случайным образом из значений, определенных на некоторых достаточно больших интервалах положительных вещественных чисел. При определении границ интервалов принимаются во внимание биологические соображения, теоретические оценки и/или результаты предыдущих серий численных экспериментов. Следует иметь также в виду, что обеспечение разнообразия индивидуумов (особенно для нулевого поколения) может стать во многом гарантией эффективной работы ВГА, при этом для последующих поколений число z не обязательно совпадать с z_0 .

“Судьба” каждого индивидуума π_l в поколении зависит от значения функционала Φ , определяющего меру близости (в смысле наименьших квадратов) решения прямой задачи к экспериментальным временным рядам. Формирование каждого нового поколения осуществляется через селекцию индивидуумов предыдущего поколения: по результатам решения серии прямых задач из z индивидуумов для нового поколения отбираются только Z “лучших”, $Z < z$. Для восстановления численности популяции до z индивидуумов на этапе рекомбинации выбираются два произвольных индивидуума-родителя, которые дают начало новым индивидуумам. Новые подвергаются затем мутации и клонированию, для того чтобы обеспечить определенное разнообразие индивидуумов. Конкретная реализация этапов рекомбинации, мутации и клонирования предполагает использование элементов случайности [37–40].

Итерационный процесс формирования нового поколения осуществляется, пока не выполняются условия сходимости в себе последовательности значений минимального в каждом поколении функционала (с достаточно высокой степенью точности), а также (желательно с той же степенью точности) последовательности значений каждого определяемого параметра. Отметим, что в численных экспериментах управляющие параметры генетического алгоритма ВГА варьировались в следующих диапазонах значений:

$z_0 \in [200, 1600]$, $z \in [200, 1600]$, при этом на основе результатов методических расчетов оптимальными полагались $z \in [200, 400]$, $z = z_0$, $Z = 0.3z$. Остальные параметры ВГА задавались теми же, что и в [37]. Расчеты показали также, что в представленных ниже численных экспериментах оптимальное число поколений составляет $30 \leq N_{gen} \leq 60$; основные расчеты, если это не оговорено особо, проводились при $N_{gen} = 40$.

Для каждой решаемой задачи осуществлялось от 20 до 60 равноценных запусков ВГА, а далее на полученной выборке для каждого параметра подсчитывались медианное значение и квартили $Q1$ и $Q3$. Оптимальный набор значений параметров (решение обратной коэффициентной задачи) определялся, в первую очередь, минимальным значением функционала, полученным для центральных 50 % индивидуумов выборки. При этом выдвигалось строгое требование положительной определенности параметров и неотрицательности компонент решения, естественное для данного класса математических моделей (отметим, что в рамках данной работы нарушений этих требований не наблюдалось). В качестве дополнительного условия, влияющего на выбор оптимального набора параметров, рассматривалось соответствие качественных свойств полученного решения прямой задачи известным биологическим представлениям.

Отметим, что в некоторых сериях расчетов требовалось одновременное решение задач структурной и параметрической идентификации новой модели или отдельных уравнений, дополняющих базовую модель. Оно проводилось с привлечением ВГА и экономичной вычислительной технологии [37], основанной на идее расщепления задачи идентификации на последовательность более простых задач. Технология состоит в том, что весьма сложная задача со множеством неопределенностей разбивается на два этапа — сначала структурная и параметрическая идентификация каждого нового уравнения проводится индивидуально с привлечением экспериментальных данных или известных численных решений, полученных для остальных фазовых переменных (этап “расщепления”), а затем из готовых элементов производится сборка новой модели. Этот алгоритм позволяет существенно понизить уровень сложности задачи идентификации и значительно сократить временные затраты. Важной частью технологии является использование монотонной сплайн-интерполяции для заполнения пробелов в экспериментальных временных рядах (в связи с дисбалансом в количестве определяемых параметров и экспериментальных измерений) при решении обратных коэффициентных задач, а также в качестве замены численных решений (в каждом узле расчетной сетки) в задаче структурной идентификации уравнений.

3. Методические расчеты

Анализ работы ВГА. При анализе работы стохастического генетического алгоритма ВГА в качестве “модельной” рассматривалась задача о функционировании системы белков p53 — Mdm2 в условиях, приближенных к условиям лабораторных экспериментов [41] с раковыми клетками, подвергнутыми воздействию этопозидом. Ниже (см. подразд. 4.1) биологические аспекты данной задачи будут проанализированы более детально, а на настоящем этапе сосредоточим внимание на методических вопросах.

Математическое моделирование динамики системы p53 — Mdm2 осуществляется с привлечением базовой модели, где также полагалось $b_3 = 0$ (далее эта модель будет упоминаться как модель 1а, она совпадает с моделью [31, 32]):

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t),$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t).$$

Эта простейшая модель используется в связи с тем, что в лабораторных экспериментах [41] микроРНК не принимались во внимание и, следовательно, их влияние в принятой модели может быть отнесено к группе неучтенных воздействий (см. разд. 1). Начальные условия задавались согласованными с экспериментальными данными [41], характерный масштаб времени устанавливался равным $T = 1$ мин из соображений удобства сопоставления с условиями лабораторного эксперимента. Ввиду отсутствия более конкретных лабораторных данных для простоты предполагалось, что уровень этопозида поддерживается постоянным во все время эксперимента. Это позволяет упростить задачу описания условий лабораторного эксперимента [41], сведя ее к определению значений параметров модели 1a.

В ходе численных экспериментов в методических целях численность индивидуумов в каждом поколении ВГА поочередно полагалась равной $z = 200, 400, 800, 1600$; точно так же варьировалось количество поколений $N_{gen} \leq 60$. При определении начального диапазона изменения значений каждого параметра в нулевом поколении ВГА (множество интервалов I_0) принимался во внимание биологический смысл экспериментов [41], а также то, что набор параметров (4) ранее рассматривался как описывающий базальное состояние системы р53 — ингибитор [31, 32]. Для каждого варианта расчета проводилось от 40 до 60 равноценных запусков ВГА. В табл. 1 можно видеть набор параметров Opt [41], который принят в настоящей серии численных экспериментов как оптимальный. Здесь же для каждого параметра представлены медианные значения Med (нижние индексы указывают на значение z в ВГА) и квантили $Q1$ и $Q3$. Дополнительно показаны результаты анализа устойчивости решения обратной задачи к “шуму” в экспериментальных данных, который моделировался 5%-ным изменением каждого измеренного в экспериментах значения в сторону роста и убывания (соответствующие статистические характеристики помечены верхними индексами $^+$ и $^-$). Видно, что полученные данные демонстрируют достаточно слабую зависимость от варьируемых параметров ВГА и малых вариаций экспериментальных данных. Интересно, что оптимальные значения параметров, соответствующие экспериментам [41], в основном не противоречат нашим оценкам параметров модели и состояния системы р53 — ингибитор [26], в том числе полученным ранее при описании более общего эксперимента [5] (речь идет, в первую очередь, об оценке поведения р53). Ниже будет показано, что результаты решения соответствующей оптимальному набору параметров прямой задачи согласуются с экспериментальными данными [41].

О предельном переходе от системы с запаздыванием к системе ОДУ и наоборот. В методических целях в данной биологической постановке задачи была рассмотрена математическая модель без запаздывающего аргумента, построенная с использованием идеи гипотетических генных сетей [42]. Модель без запаздывающего аргумента получена из модели 1a в результате замены уравнения с запаздыванием системой ОДУ (модель 1b):

$$\begin{aligned} \frac{d\tilde{y}_1}{dt} &= a_1 - a_2 f(\tilde{y}_1, x_n, k_f) - a_3 \tilde{y}_1, \\ \frac{dx_1}{dt} &= b_1 g(\tilde{y}_1, x_n, k_g, k_f) - \frac{n-1}{\tau_1} x_1, \\ \frac{dx_i}{dt} &= \frac{n-1}{\tau_1} (x_{i-1} - x_i), \quad i = 2, \dots, n-1, \end{aligned}$$

$$\frac{dx_n}{dt} = \frac{n-1}{\tau_1} x_{n-1} - b_2 x_n,$$

где $x_1(t), \dots, x_n(t)$ — дополнительные переменные, описывающие гипотетические промежуточные стадии функционирования системы р53 — Mdm2. Предполагается, что при нулевых начальных условиях $\lim_{n \rightarrow \infty} \tilde{y}_1(t) \rightarrow y_1(t)$, $\lim_{n \rightarrow \infty} x_n(t) \rightarrow y_2(t)$, причем $\lim_{n \rightarrow \infty} x_i(t) \rightarrow 0$ ($1 < i < n$). Для оценки погрешности предельного перехода в ходе численных экспериментов решение системы ОДУ (модели 1b) сопоставляется с известным решением исходной системы с запаздыванием (модели 1a), полученным на достаточно подробной расчетной сетке и принятым в качестве “точного”. Отметим, что в [33, 43] для моделей 1a и 1b уже подтверждено существование предельного перехода от системы ОДУ большой размерности к уравнению с запаздыванием и наоборот. Численно было показано также существование условия курантовского типа, гарантирующего устойчивость численной реализации предельного перехода: $n \leq C\tau_1/h$ (значение C зависит от применяемого численного метода решения задачи).

В настоящей работе эти результаты были продемонстрированы в численных экспериментах с лабораторными данными [41]. Число гипотетических “промежуточных” стадий n варьировалось в расчетах от 4 до 10^5 . В ходе расчетов естественный процесс наращивания числа промежуточных стадий n , как и в [33, 43], сопровождался нарушениями процесса сходимости при $n > C\tau_1/h$, причем $C \approx 1$. Получено также, что при достаточно больших n скорость сходимости решений в предельном переходе определяется асимптотическим законом n^{-1} , что несколько опережает теоретический результат [42] (совпадение с теорией можно было наблюдать лишь при умеренных значениях n).

Отметим, что с применением модели 1b проводились также расчеты обратной коэффициентной задачи. Цель состояла в определении оптимального набора параметров модели, обеспечивающего близость ее решения (в смысле минимума функционала) к экспериментальным данным [41], причем число промежуточных стадий n полагалось неизвестным параметром, подлежащим определению. Полученные оптимальные значения параметров модели 1b близки к оптимальному набору параметров $Opt^{[41]}$ модели 1a с запаздыванием (данные представлены в табл. 1). При этом близость решения модели 1b к экспериментальным данным достигается уже при весьма малом $n \approx 24$ (медианное значение составляло $n = 25$ на выборке из 20 запусков BGA).

Анализ чувствительности модели 1 к изменению значений параметров. Использовался “прямой” локальный метод [44], в рамках которого коэффициенты чувствительности s_{ij} определялись непосредственно из решения системы ОДУ

$$\frac{ds_j}{dt} = J \cdot s_j(t) + \sigma_j(t), \quad s_j(0) = 0, \quad j = 1, \dots, M,$$

присоединенной к основной системе вида (5). Здесь J — матрица Якоби с элементами $J_{il} = \partial f_i / \partial y_l$; $\mathbf{y} = (y_1, \dots, y_n)$ — вектор решения исследуемой модели (5); $\mathbf{F} = (f_1, \dots, f_n)$ — вектор правой части (5); $\mathbf{s}_j = (s_{1j}, \dots, s_{nj})$; $\sigma_j = (\partial f_1 / \partial p_j, \dots, \partial f_n / \partial p_j)$; $\mathbf{P} = (p_1, \dots, p_M)$ — вектор параметров модели; все частные производные вычисляются аналитически.

Исследование чувствительности проводилось для двух вариантов решений базовой модели 1, соответствующих существенно разным конфигурациям системы р53 — микроРНК — достаточно слабо и, наоборот, сильно выраженной положительной обратной связи. Первая из этих конфигураций определялась набором параметров (4), а вторая —

Т а б л и ц а 1. Начальные диапазоны и статистика решений обратной коэффициентной задачи для моделей 1а и 1б, применяемых к описанию экспериментальных данных [41]

Table 1. Initial ranges and statistics of solutions of the inverse coefficient problem for models 1a and 1b, applied to the description of experimental data [41]

	a_1	a_2	a_3	b_1	b_2	k_f	k_g	τ_1
Модель 1а, этопозид 100 мкмоль/л								
I_0	[0.5; 2]	$[10^{-4}; 10^{-1}]$	$[10^{-5}; 10^{-3}]$	[0.5; 2]	$[10^{-3}; 0.3]$	[150; 350]	[20; 52]	[100; 300]
$Opt^{[41]}$	1.36	$1.83 \cdot 10^{-2}$	$6.02 \cdot 10^{-4}$	1.1	$3.20 \cdot 10^{-2}$	271.34	33.76	220.0
Med_{200}	1.33	$2.72 \cdot 10^{-2}$	$5.47 \cdot 10^{-4}$	1.54	$6.35 \cdot 10^{-2}$	272.95	37.47	219.15
[Q1; Q3]	[1.28; 1.48]	$[1.82 \cdot 10^{-2}; 3.24 \cdot 10^{-2}]$	$[4.14 \cdot 10^{-4}; 6.96 \cdot 10^{-4}]$	[0.914; 1.76]	$[3.17 \cdot 10^{-2}; 7.32 \cdot 10^{-2}]$	[241.44; 300.86]	[33.41; 43.67]	[216.92; 221.21]
Med_{200}^+	1.36	$3.37 \cdot 10^{-2}$	$4.86 \cdot 10^{-4}$	1.45	$6.12 \cdot 10^{-2}$	246.31	41.84	219.80
[Q1; Q3] ⁺	[1.29; 1.45]	$[1.95 \cdot 10^{-2}; 3.75 \cdot 10^{-2}]$	$[3.06 \cdot 10^{-4}; 5.53 \cdot 10^{-4}]$	[1.32; 1.73]	$[5.44 \cdot 10^{-2}; 7.03 \cdot 10^{-2}]$	[235.84; 286.49]	[30.37; 46.06]	[216.53; 222.13]
Med_{200}^-	1.41	$1.76 \cdot 10^{-2}$	$6.93 \cdot 10^{-4}$	1.69	$7.05 \cdot 10^{-2}$	267.12	35.93	217.23
[Q1; Q3] ⁻	[1.22; 1.45]	$[1.24 \cdot 10^{-2}; 2.43 \cdot 10^{-2}]$	$[6.54 \cdot 10^{-4}; 9.25 \cdot 10^{-4}]$	[1.30; 1.94]	$[5.42 \cdot 10^{-2}; 8.19 \cdot 10^{-2}]$	[234.52; 321.00]	[28.99; 41.72]	[213.37; 222.47]
Med_{400}	1.30	$1.66 \cdot 10^{-2}$	$5.71 \cdot 10^{-4}$	1.57	$6.54 \cdot 10^{-2}$	282.39	32.65	220.36
Med_{800}	1.34	$3.02 \cdot 10^{-2}$	$4.74 \cdot 10^{-4}$	1.42	$5.94 \cdot 10^{-2}$	302.96	40.39	219.34
Med_{1600}	1.30	$2.12 \cdot 10^{-2}$	$6.07 \cdot 10^{-4}$	1.33	$5.41 \cdot 10^{-2}$	248.16	37.03	218.09
Модель 1б, этопозид 100 мкмоль/л								
$Opt^{[41]}$	1.30	$1.82 \cdot 10^{-2}$	$6.32 \cdot 10^{-4}$	0.943	$4.04 \cdot 10^{-2}$	261.89	25.34	230.0

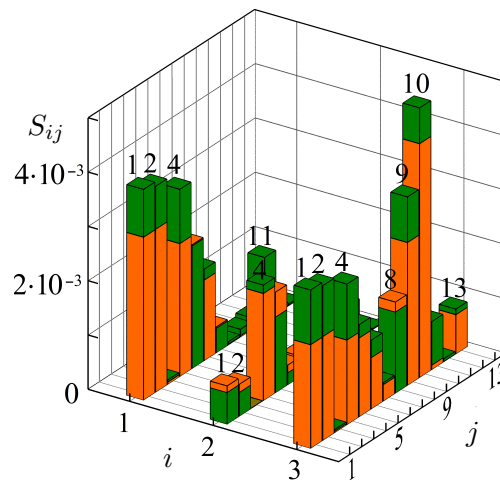


Рис. 2. Коэффициенты относительной чувствительности модели 1 к малому изменению значений параметров: *оранжевые столбцы* — $b_3 = b_3^0$, *зеленые* — $b_3 = 10b_3^0$.

Fig. 2. Coefficients of relative sensitivity of model 1 to small changes in parameter values: *orange columns* — $b_3 = b_3^0$, *green columns* — $b_3 = 10b_3^0$.

увеличением в этом наборе параметра $b_3 = 10b_3^0$. Результаты анализа представлены на рис. 2 в виде гистограммы матрицы коэффициентов относительной чувствительности:

$$S_{ij} = \frac{1}{N_t} \left[\sum_{q=1}^{N_t} \left(s_{ij}(t_q) \frac{p_j^0}{y_i^0} \right)^2 \right]^{1/2},$$

где характерные значения параметров p_j^0 (базальные значения) и компонент решения y_i^0 (стационарные значения при базальных параметрах) играют роль нормирующих множителей. Здесь t_q — узлы расчетной сетки в численных методах решения прямой задачи, N_t — число узлов, $\mathbf{P} = (p_1, \dots, p_{13}) = (a_1, a_2, a_3, b_1, b_2, k_f, k_g, c_1, c_2, c_3, b_3, k_m, k_p)$. Расчеты показали, что каждая компонента решения наиболее чувствительна к изменению параметров, входящих в соответствующее ей уравнение. Кроме того, модель чувствительна к параметру b_1 , который регулирует воздействие р53 на белок-ингибитор, уравнение динамики уровня р53 чувствительно к изменениям параметров b_2, k_f и b_3 , а уравнение динамики микроРНК — к изменениям параметров a_1 и a_2 . Это показывает, что в рамках данной модели взаимодействия элементов системы играют важную роль, хотя и роль параметров, регулирующих конститутивные процессы, также высока. Как и ожидалось, с усложнением биологической модели (увеличением параметра b_3) список параметров, к которым модель весьма чувствительна, практически не изменился, хотя значения коэффициентов относительной чувствительности несколько возросли.

В последующих разделах статьи будут представлены разработанные на основе математической модели 1 новые модели динамики сигнального пути р53, а также содержательные примеры использования этих моделей для описания свойств биологической системы, наблюдаемых в лабораторных экспериментах. Для ясности полученный при описании каждого лабораторного эксперимента оптимальный набор параметров Opt будет отмечен ссылкой на соответствующую экспериментальную работу, например $Opt^{[41]}$, а отдельные параметры набора будут иметь отметку Opt .

4. Численный анализ функционирования сигнального пути р53 при противораковых терапевтических воздействиях

4.1. Механизм бимодального переключения динамики р53 в зависимости от уровня повреждения ДНК

Известно, что при отсутствии повреждения ДНК петля отрицательной обратной связи между р53 и Mdm2 поддерживает в клетке достаточно низкий уровень р53 (это характерно для нормальных клеток, но еще более выражено в раковых клетках с р53 дикого типа), а при наличии повреждения экспериментаторы наблюдают переключение системы р53 — Mdm2 на режим с монотонным увеличением р53 (бимодальный переключатель). В частности, в лабораторных экспериментах [41] с клетками остеосаркомы человека (линия раковых клеток U2OS с р53 дикого типа) изучалась динамика р53 при воздействии на клетку этопозида — известного противоопухолевого препарата, который оказывает цитотоксическое действие, вызывая повреждение ДНК и тем самым активацию р53-зависимого апоптоза клетки-мишени. Механизм этого воздействия состоит в том [41, 45], что повреждение ДНК приводит к АТМ-зависимому фосфорилированию р53 и Mdm2. Это повышает уровень и активность р53 через ослабление регуляторной функции Mdm2, а также способствует саморазрушению Mdm2. В [41] выполнено сравнение динамики р53 и Mdm2 при воздействии на клетку относительно малой (1 мкмоль/л) и большой (100 мкмоль/л) дозами этопозида. Отмечается, что в обоих случаях данные демонстрируют монотонное увеличение р53, особенно ярко выраженное при высокой дозе этопозида. При малой дозе действующего вещества этот рост выражен гораздо слабее, но интересно также, что весьма вероятен и импульсный режим с одним или

несколькими пиками уровня р53. Следует отметить, что эти данные подтверждаются многими лабораторными исследованиями (см., например, [4, 5, 45, 46]).

Чтобы продемонстрировать способность модели 1a воспроизвести данный механизм реагирования на дефекты ДНК, для каждой из описанных серий лабораторных измерений [41] решалась серия обратных коэффициентных задач. На рис. 3 представлены распределения во времени уровней р53 и Mdm2, полученные в расчетах и в экспериментах [41], а в табл. 2 — соответствующие оптимальные наборы значений параметров $Opt^{[41]}$. Можно видеть, что независимо от дозы этопозида в численных экспериментах уровень р53 повышался, но он был существенно выше при высокой дозе препарата, чем при низкой дозе, что согласуется с наблюдениями за живыми клетками. Эти изменения сопровождалась также изменениями в динамике белка-ингибитора: уровень Mdm2 неуклонно возрастал под воздействием 1 мкмоль/л этопозида и в значительной степени был подавлен при повышении дозы до 100 мкмоль/л. Численные данные согласуются с результатами лабораторных исследований в том, что ослабление регуляции р53 со стороны Mdm2 при сильном повреждении ДНК может позволить р53 накапливаться монотонно до весьма высокого уровня, и эта динамика принципиально отличается от импульсного режима, вызванного низким повреждением.

Кроме того, анализ численных решений подтверждает выводы лабораторных исследований о том, что усиление процессов саморазрушения Mdm2 (опосредованное повышенной активностью белка ATM, который явно не учитывается в модели) под действием высоких доз этопозида является одним из ключевых механизмов, лежащих в основе ослабленной регуляции роста Mdm2. Дело в том, что комбинированное воздействие на систему этопозида, связанное одновременно с ослаблением регуляции р53 со стороны Mdm2 и усилением деградации (саморазрушения) Mdm2, формирует двойной отрицательный контроль Mdm2, который не скомпенсирован положительным влиянием р53 на Mdm2 и поэтому способен запустить монотонное увеличение р53 в клетках U2OS в ответ на высокий уровень препарата. Эти выводы нашли также отражение в изменениях

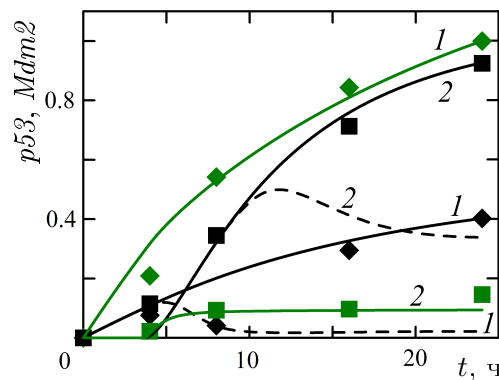


Рис. 3. Фолд-изменение уровней белков р53 (1) и Mdm2 (2) под воздействием этопозида: черные линии и маркеры — доза 1 мкмоль/л, зеленые — 100 мкмоль/л. Сплошные линии — модель 1a с наборами параметров $Opt^{[41]}$ и $Opt_{mon}^{[41]}$, штриховые линии — $Opt_{puls}^{[41]}$; экспериментальные данные [41]: ромбы — р53, квадраты — Mdm2

Fig. 3. Fold-changes in the levels of p53 (1) and Mdm2 (2) proteins under the influence of etoposide: black lines and markers — a dose of 1 $\mu\text{mol/l}$, green — 100 $\mu\text{mol/l}$. Solid lines — model 1a with parameter sets $Opt^{[41]}$ and $Opt_{mon}^{[41]}$, dashed lines — $Opt_{puls}^{[41]}$; experimental data [41]: rhombuses — p53, squares — Mdm2

Т а б л и ц а 2. Оптимальные значения параметров модели 1а для описания экспериментальных данных [41], полученные в ходе решения обратной коэффициентной задачи

Table 2. Optimal values of the parameters of model 1a for describing the experimental data [41], obtained by solving the inverse coefficient problem

	a_1	a_2	a_3	b_1	b_2	k_f	k_g	τ_1
Модель 1а, этопозид 100 мкмоль/л								
$Opt^{[41]}$	1.36	$1.83 \cdot 10^{-2}$	$6.02 \cdot 10^{-4}$	1.1	$3.20 \cdot 10^{-2}$	271.34	33.76	220.0
Модель 1а, этопозид 1 мкмоль/л								
$Opt_{mon}^{[41]}$	0.46	10^{-3}	$4.9 \cdot 10^{-4}$	1	$2.4 \cdot 10^{-3}$	260	35.60	220.0
$Opt_{puls}^{[41]}$	0.46	$7 \cdot 10^{-3}$	$4.9 \cdot 10^{-4}$	1	$2.4 \cdot 10^{-3}$	260	35.60	220.0

параметров модели 1а, полученных в результате решения обратных коэффициентных задач при разных дозах этопозида.

Анализ численных решений прямых и обратных задач позволил также выдвинуть гипотезу о возможной причине возникновения двух режимов динамики р53 при воздействии малой (1 мкмоль/л) дозы этопозида, которые были продемонстрированы в экспериментах [41]: в клетках с более сильной регуляцией р53 со стороны Mdm2 после небольшого пика уровень р53 может сохраняться на достаточно низком уровне (решение показано пунктирными линиями на рис. 3, ему соответствует набор параметров $Opt_{puls}^{[41]}$ в табл. 2), а в случае более слабой регуляции возможно умеренное монотонное увеличение уровня р53 (сплошные черные линии на рис. 3 получены с использованием набора параметров $Opt_{mon}^{[41]}$ в табл. 2).

Таким образом, анализ численных решений показал, что в рамках принятой математической модели за бимодальное переключение под воздействием этопозида в сети р53 отвечает сразу несколько механизмов: не связанные с взаимодействием р53 и Mdm2 “конститутивные” процессы активации и деградации р53 (параметры a_1 и a_3), ингибирующее влияние Mdm2 на р53 (параметр a_2) и саморазрушение Mdm2 (b_2). Это согласуется с выводами [41, 45], основанными на данных лабораторных наблюдений.

4.2. Динамика системы р53 — Wip1 — miR-16 в клетках остеосаркомы человека

В настоящем разделе основное внимание уделено особенностям функционирования еще одного важного сегмента сигнального пути р53 — системы р53 — Wip1 — miR-16. Белок Wip1 (Wild-type р53-induced phosphatase 1) способствует образованию и развитию опухолей в качестве онкогена и негативного регулятора р53. Как и р53, он также участвует в регуляции старения, играет важную роль в патогенезе неврологических и иммунных заболеваний. Будучи сверхэкспрессирован в нескольких видах раковых опухолей человека, Wip1 действует как критический ингибитор сигнального пути р53 при повреждении ДНК, а miR-16, нацеленные на мРНК Wip1, отрицательно регулируют уровень экспрессии белка Wip1. Таким образом, между miR-16 и р53 действует петля положительной обратной связи.

В одном из лабораторных экспериментов [11] раковые клетки линии U2OS остеосаркомы человека (со сниженным уровнем miR-16) подвергались внешнему воздействию ионизирующим облучением с той же целью, что и в [41], — через искусственное повреждение ДНК активировать интересующий сегмент сигнального пути р53 (этот метод

широко известен как один из вариантов радиотерапии раковых клеток). В результате исследований в [11] получены данные, демонстрирующие важную роль miR-16 в регуляции Wip1.

Сопоставление с экспериментальными данными [11]. Для формального описания механизма реагирования сигнального пути p53 и его сегмента Wip1 — miR-16 на повреждение ДНК воспользуемся сначала математической моделью 1, в которой будем полагать, что y_1 , y_2 , y_3 — уровни p53, Wip1 и miR-16 соответственно. Для функций y_1 , y_2 , y_3 задавались нулевые начальные условия, для согласования с условиями лабораторного эксперимента характерный масштаб времени T полагался равным 1 мин. Как и в предыдущей серии численных расчетов, с привлечением BGA ($z = 400$, $N_{gen} = 40$) решалась обратная коэффициентная задача, в ходе которой был определен оптимальный набор значений параметров модели $Opt^{[11]}$, обеспечивающий согласие с экспериментальными данными [11]. Результаты численных экспериментов представлены на рис. 4. Можно видеть, что численное решение, соответствующее набору параметров $Opt^{[11]}$, весьма близко к данным лабораторного эксперимента [11]. При этом, как и в [11], в численном эксперименте система p53 — Wip1 — miR-16 демонстрирует один всплеск уровней белков и микроРНК, причем уровень Wip1 изменяется в противофазе с p53 и miR-16, что полностью соответствует типу их взаимосвязи.

О динамике системы до облучения. Основываясь на полученном решении задачи, представляется интересным рассмотреть возможные механизмы, приводящие биологическую систему в состояние активации пути p53 [11]. С этой точки зрения, в первую очередь, полезно иметь представление о динамике системы в раковой клетке до ее облучения (в рамках принятой математической модели). Мы исходим из общепринятого факта: повреждение ДНК облучением, наблюдаемое в [11], вызывает повышенную экспрессию белка p53 посредством снижения регуляторной функции белка-ингибитора Wip1 (в рамках принятой модели этот механизм реализуется через уменьшение параметра a_2), и тогда увеличение уровня p53 должно привести к активации петли положительной обратной связи p53 — miR-16 и вызвать заметное снижение уровня Wip1 под воздействием микроРНК. Учитывая это, при моделировании состояния, предшествующего облучению, будем, наоборот, увеличивать значение a_2 в наборе $Opt^{[11]}$, предполагая, что это должно привести к снижению уровней p53 и miR-16 и повышению уровня Wip1. Численное решение, которое получено при $a_2 = 1.5a_2^{Opt}$, показано на рис. 4 штриховыми линиями. Видно, что уровни p53 и микроРНК действительно снижаются примерно на 30 и 50 % соответственно по сравнению с контрольным состоянием (здесь оценивается отклонение стационарных решений), а вот уровень Wip1 практически не изменяется. Дальнейшее увеличение параметра a_2 , хотя и вызывает отклик системы, но не приводит к кардинальному изменению ее состояния.

Таким образом, вопреки ожиданиям в обсуждаемых условиях в рамках принятой математической модели наблюдается затухание сигнального пути p53, охватывающее все рассматриваемые звенья этой системы. Можно отметить, что общая тенденция этих изменений — снижение уровней обоих белков и микроРНК — может быть охарактеризована как приближение к дострессовому состоянию пути p53 в нормальных клетках, как правило, наблюдаемому *in vitro*. Вместе с тем полученные численные результаты свидетельствуют о нарушении отрицательной обратной связи p53 — Wip1, что противоречит представлениям о нормальном функционировании этой системы и скорее характерно для раковой клетки (это соответствует условиям проведения лабораторных измерений [11]).

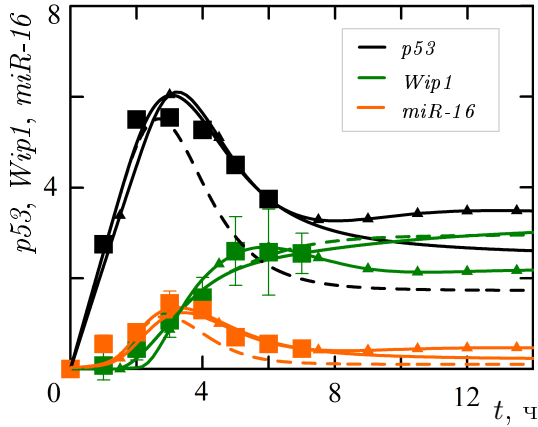


Рис. 4. Динамика нормированных уровней p53, Wip1 и miR-16 в клетках линии U2OS остеосаркомы человека. Состояние после облучения: *квадраты* — экспериментальные данные [11], *сплошные линии* — модель 1 с набором параметров $Opt^{[11]}$, *сплошные маркированные линии* — модель 2; *штриховые линии* — моделирование состояния до облучения (модель 1 при $a_2 = 1.5a_2^{Opt}$)

Fig. 4. Dynamics of normalized levels of p53, Wip1 and miR-16 in U2OS cells (human osteosarcoma line). State after irradiation: *squares* — experimental data [11], *solid lines* — model 1 with a set of parameters $Opt^{[11]}$, *solid marked lines* — model 2; *dashed lines* — simulation of the state before irradiation (model 1 at $a_2 = 1.5a_2^{Opt}$)

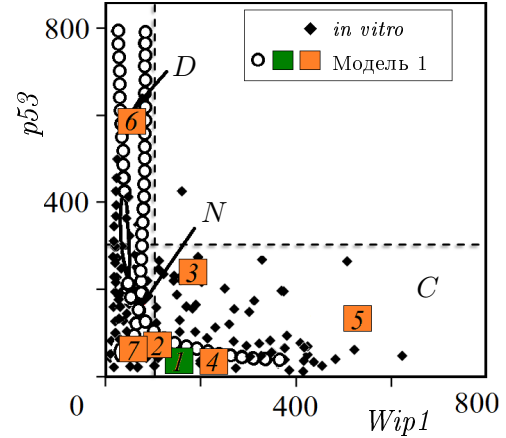


Рис. 5. Фазовый портрет состояний сети p53 — Wip1: *ромбы* — лабораторные данные [5]; *круги* — модель 1, поочередное варьирование параметров (4); *квадраты* — модель 1, варьирование параметров $Opt^{[11]}$ (1 — $Opt^{[11]}$, 2 — $a_2 = 0.625a_2^{Opt}$, 3 — $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$, 4 — $b_3 = 0$, 5 — $b_3 = 0$ и $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$, 6 — $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$ и $b_3 = 3.75b_3^{Opt}$, 7 — $b_3 = 3.75b_3^{Opt}$)

Fig. 5. Phase portrait of the p53 — Wip1 network states: *rhombuses* — laboratory data [5]; *circles* — model 1, alternating parameter variation (4); *squares* — model 1, parameter variation $Opt^{[11]}$ (1 — $Opt^{[11]}$, 2 — $a_2 = 0.625a_2^{Opt}$, 3 — $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$, 4 — $b_3 = 0$, 5 — $b_3 = 0$ и $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$, 6 — $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$ и $b_3 = 3.75b_3^{Opt}$, 7 — $b_3 = 3.75b_3^{Opt}$)

Сопоставление с экспериментальными данными [5, 11]. Для лучшего понимания полученных результатов предпринималась попытка оценить их с позиций более полного лабораторного эксперимента [5], в котором, как и в [11], изучалась реакция системы p53 — Wip1 на облучение клеток. При этом удобно воспользоваться безразмерными значениями фазовых переменных, отказавшись от дополнительной обработки данных, принятой в [11]. Результаты анализа можно видеть на рис. 5, где на фазовой плоскости ($p53$, $Wip1$) представлены рассчитанные предельные циклы и стационарные решения модели 1, полученные при поочередном варьировании параметров из набора (4) и параметра запаздывания, а также стационарные решения модели 1, полученные при варьировании набора значений параметров $Opt^{[11]}$. Здесь же приведены данные лабораторных измерений [5] с выделенными областями трех характерных состояний системы — условной нормы (N), угрозы рака (C) и массовой гибели клеток, приводящей к патологической дегенерации органов (D). Отметим, что выделение на рис. 5 вертикальной и горизонтальной штриховыми линиями верхних границ условной (произвольно выбранной в рамках модели) нормы для Wip1 и p53 согласовано с оценками, сделанными в [5]. Основываясь на принятом здесь представлении данных, можно предположить, что состояние системы p53 — Wip1 после облучения клетки (далее —

контрольное состояние, маркер 1 на рис. 5), которое определяет условия проведения эксперимента [11], характеризуется достаточно низким уровнем активации пути р53 (обезразмеренные стационарные значения уровней р53, Wip1 и miR-16 составляют 23.1, 158.7 и 34.3 соответственно). На это обстоятельство указывает также полученный в эксперименте [11] импульсный режим функционирования системы р53 — Wip1 — miR-16 (см. рис. 4).

Скрытая положительная обратная связь р53 — Wip1. Сформулированная (в рамках принятой модели) оценка контрольного состояния системы р53 — Wip1 не вступает в противоречие с нашим пониманием основной цели лабораторного эксперимента [11], которая состояла в изучении механизма активации пути р53 как такового. Расчеты показали, что при уменьшении значения параметра a_2 , которое имитирует увеличение стрессовой нагрузки на клетку, модель демонстрирует нормальное функционирование отрицательной обратной связи р53 — Wip1: характерные уровни р53 и микроРНК ожидаемо повышаются, а уровень Wip1 снижается, что обусловлено усилением влияния микроРНК (так, при $a_2 = 0.625a_2^{Opt}$ уровни белков и микроРНК равны 44.6, 124.3 и 151.9 соответственно, это состояние показано маркером 2 на рис. 5). Однако дальнейшее снижение a_2 в интервале значений $0.208a_2^{Opt} < a_2 < 0.625a_2^{Opt}$ изменяет картину, потому что уровень Wip1 начинает расти (хотя пока не превышает контрольного уровня). При $a_2 < 0.208a_2^{Opt}$ уровень р53 повышается почти в 10 раз, и в этих условиях уровень Wip1 становится не меньше, а даже больше по мере уменьшения значения a_2 (для примера решение, полученное при $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$, показано маркером 3 на рис. 5). Такое поведение системы р53 — Wip1 — miR-16, не согласующееся с известными представлениями о характере связей в системе (см. рис. 1), очевидно, может возникать как результат доминирования положительного воздействия р53 на Wip1 над регуляторной функцией микроРНК. Для подтверждения этой гипотезы на рис. 5 показаны решения, полученные при $b_3 = 0$, т. е. при полном отсутствии воздействия микроРНК на Wip1 (маркер 4 — стационарные значения при $b_3 = 0$ и $a_2 = a_2^{Opt}$, маркер 5 — при $b_3 = 0$ и $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$). Можно видеть, что в этом “предельном” случае снижение a_2 действительно приводит к увеличению уровня Wip1.

Очевидно, что описанный эффект напрямую связан с тем, что на белок Wip1 одновременно воздействуют р53 (положительное воздействие) и miR-16 (отрицательное воздействие). Наблюдаемый в рамках принятой модели эффект роста Wip1 в условиях нарастания стрессовой нагрузки и ослабления регуляторной функции микроРНК рассматривается в экспериментальной работе [11] как проявление неявной положительной обратной связи в системе р53 — ингибитор. Отметим, что в целом ряде лабораторных исследований, включая [11], замечено, что при облучении клетки уровни р53 и микроРНК растут, а вместе с этим усиливаются и соответствующие воздействия на Wip1, результат которых, по-видимому, не всегда “однозначен”.

О сверхэкспрессии микроРНК как способе подавления Wip1 и синергическом эффекте сверхактивации пути р53 под контролем микроРНК. В продолжение этих экспериментов ставилась задача об уточнении (в рамках эксперимента [11]) роли miR-16 в данной биологической системе, в частности — как фактора противоопухолевой терапии. Это потребовало моделирования динамики системы в более широком диапазоне фазовых состояний, в том числе достижения убедительного терапевтического эффекта за счет гиперактивации р53. Анализировались численные решения, полученные варьированием значений ряда параметров, регулирующих динамику микроРНК; за основу взят оптимальный набор Opt [11]. На данном этапе в рамках модели 1

проводились численные эксперименты, в которых варьировались только параметры, регулирующие генерацию и деградацию микроРНК за счет конститутивных и неучтенных явно процессов. Результаты численных экспериментов подтверждают выводы [11]: сверхэкспрессия miR-16 способствует подавлению индукции Wip1, чувствительной к повреждению ДНК, а ингибирование miR-16 ускоряет и усиливает индукцию Wip1. Однако полученные в рамках принятой модели изменения, по-видимому, нельзя расценивать как критические для всей системы, поскольку они вызывают весьма умеренную реакцию р53. В частности, в рамках принятой модели при $c_1 = 100c_1^{Opt}$ стационарный уровень miR-16 увеличивался в 32 раза, а уровень Wip1 снижался лишь на 50% (по сравнению с контрольным значением, отмеченным маркером 1 на рис. 5). И наоборот, при $c_3 = 10c_3^{Opt}$ уровень miR-16 упал почти до нуля, а уровень Wip1 вырос только на 38%.

Анализ численных решений показал, что только одновременное увеличение дозы облучения (уменьшение a_2) и усиление влияния микроРНК на Wip1 (увеличение b_3) приводят к гиперактивации р53 и существенному снижению уровня Wip1, что может рассматриваться как иллюстрация синергического эффекта, обеспечивающего (с большой долей вероятности) массовый запуск р53-зависимого апоптоза раковых клеток. Пример такого решения модели 1 приведен на рис. 5 (маркер 6): для решения при $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$, $b_3 = 3.75b_3^{Opt}$ (остальные параметры равны оптимальным значениям параметров) характерен весьма высокий уровень р53 при достаточно низком уровне Wip1 (состояние D). Можно видеть также, что подобное состояние не достигается воздействием только на одно из звеньев положительной обратной связи р53 — микроРНК — только за счет $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$ (маркер 3 на рис. 5) или только при $b_3 = 3.75b_3^{Opt}$ (маркер 7 на рис. 5). Отметим, что синергический эффект при функционировании положительной обратной связи р53 — микроРНК, выявленный при численном анализе лабораторных данных [11], ранее замечен авторами настоящей работы в ходе анализа решений модели 1 при очередном варьировании значений параметров относительно набора (4) (см. [26]) и не был связан с конкретными условиями проведения лабораторного эксперимента. Кроме того, сообщения о синергическом эффекте, характерном для функционирования сложной биологической системы сигнального пути р53, содержатся в экспериментальных работах [19, 22, 23].

Таким образом, результаты численного анализа решений модели 1, описывающих динамику системы р53 — Wip1 — miR-16 в условиях, приближенных к условиям лабораторных экспериментов [11], свидетельствуют о весьма сложном механизме функционирования этого сегмента сигнального пути р53. Было показано, что данный механизм может включать в себя не только заложенные в принятых моделях петли отрицательной р53 — Wip1 и положительной р53 — микроРНК обратной связи, но и действующую только в определенных интервалах изменения параметров системы положительную обратную связь р53 — Wip1, а также синергические эффекты, обусловленные функцией микроРНК miR-16 как регулятора Wip1.

Модель с учетом динамики мРНК Wip1 (модель 2). Хорошо известно (см., например, [11]), что miR-16 нацелены на мРНК Wip1, вклад которых до сих пор учитывался в базовой модели 1 лишь опосредованно, в предположении пропорциональности уровней мРНК и одноименного белка. Поэтому для более детального описания взаимодействия Wip1 и miR-16 рассматривалась также модификация модели 1 следующего вида:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t),$$

$$\frac{dy_{2m}}{dt} = b_0 + b_1 g(y_1(t - \tau_{1m}), y_{2m}(t - \tau_{1m}), k_g) - b_2 y_{2m}(t) - b_3 f(y_{2m}(t - \tau_3), y_3(t - \tau_3), k_m),$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_{1P} y_{2m}(t - \tau_{1p}) - b_{2P} y_2(t),$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t).$$

Здесь y_{2m} — уровень мРНК Wip1, остальные обозначения совпадают с принятыми в модели 1; $\tau_{1m} + \tau_{1p} = \tau_1$; $y_{2m}(0) = 0$. Учитывая общность постановок задач, значения параметров $b_1, b_2, b_{1P}, b_{2P}, \tau_{1m}, \tau_{1p}$ модели 2 определялись в ходе решения обратной задачи, остальные параметры полагались равными оптимальным значениям, полученным для модели 1.

Результаты решения обратной коэффициентной и ей соответствующей прямой задачи, представленные на рис. 4, весьма близки к полученным в расчетах с использованием модели 1 и к данным *in vitro* [11]. Видно, в частности, что уровень белка Wip1 изменялся в достаточно медленном темпе, достигнув пика через 6 ч после обработки, а уровень miR-16 повышался вскоре после обработки и достигал своего пика примерно через 2–4 ч после облучения, когда уровень белка Wip1 все еще оставался относительно низким. Результаты этих исследований, демонстрируемые на рис. 4, подтверждают адекватность принятого в модели 1 подхода к моделированию. Как и в экспериментах [11], в расчетах по модели 2 индукция белка Wip1 имеет замедленное начало по сравнению с индукцией мРНК Wip1 в ответ на повреждение ДНК.

Важно отметить также, что анализ численных решений модели 2 подтверждает выводы о синергическом эффекте и наличии неявной положительной обратной связи p53 — Wip1, сделанные в рамках модели 1. При этом динамика уровней белков менее чувствительна к изменению уровня микроРНК в рамках модели 2 по сравнению с моделью 1.

4.3. Динамика p53-зависимых микроРНК miR-34a, miR-192, miR-194 и miR-215 в клетках множественной миеломы

В качестве примера, на котором будет продемонстрирована работоспособность минимальных математических моделей динамики p53 с учетом сразу нескольких микроРНК, рассмотрим множественную миелому (ММ) — онкологическое злокачественное заболевание системы крови, относящееся к группе хронических лимфоцитарных лейкозов. Как и в целом ряде онкологических заболеваний, в раковых клетках множественной миеломы сбои в механизмах регуляции сигнального пути p53 приводят к снижению экспрессии этого белка. Это влечет за собой не только подавление апоптозного p53-зависимого сигнального пути, но и сбои в контроле клеточного цикла.

В последние годы предметом наиболее пристальных исследований стали зависимые от p53 микроРНК — потенциально одна из наиболее удачных терапевтических мишеней для преодоления последствий этих нарушений [17, 47]. Так, известно [17], что miR-34a, miR-192, miR-194 и miR-215, которые находятся под позитивным влиянием p53, подавляются в клетках множественной миеломы, но могут быть активированы p53 и затем способны регулировать экспрессию Mdm2 (этот механизм демонстрирует наличие петли положительной обратной связи перечисленных микроРНК с p53). В [17] показано также, что имеется прямая связь между экспрессией указанных микроРНК и функцио-

нальной активностью белка p21, который известен как мишень p53, регулятор программ клеточного цикла и старения.

Одним из проверенных химических способов активации p53 является воздействие на систему малыми молекулярными ингибиторами Mdm2. Так, нутлин-3 широко известен как антагонист Mdm2, который нарушает взаимодействие p53 — Mdm2, способствуя тем самым активации пути p53 в клетках с p53 дикого типа, и поэтому рассматривается как химиотерапевтическое противоопухолевое средство. В частности, в [17] получены весьма подробные данные, показывающие важную роль miR-34a, miR-192, miR-194 и miR-215 в сигнальном пути p53 и восстановлении контроля клеточного цикла в условиях, когда активация p53 и p21 в клетках множественной миеломы происходит именно таким способом. Отмечалось также, что сверхэкспрессия микроРНК в клетках ММ способна усиливать терапевтическое действие ингибиторов Mdm2 *in vitro* и *in vivo* за счет усиления их p53-активирующих эффектов.

Модель 3. Для описания эффекта активации положительной обратной связи p53 — микроРНК под влиянием нутлина в клетках множественной миеломы используется система функционально-дифференциальных уравнений, представляющая собой результат адаптации базовой модели 1 к условиям лабораторного эксперимента [17]:

$$\begin{aligned} \frac{dy_1}{dt} &= a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) \frac{k_n^{\alpha_n}}{k_n^{\alpha_n} + N^{\alpha_n}(t)} - a_3 y_1(t), \\ \frac{dy_2}{dt} &= b_0 + b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t) - \\ &- b_3^{m34} f(y_2(t - \tau_3), y_3^{m34}(t - \tau_3), k_m^{m34}) - b_3^{m215} f(y_2(t - \tau_3), y_3^{m215}(t - \tau_3), k_m^{m215}) - \\ &- b_3^{m192} f(y_2(t - \tau_3), y_3^{m192}(t - \tau_3), k_m^{m192}) - b_3^{m194} f(y_2(t - \tau_3), y_3^{m194}(t - \tau_3), k_m^{m194}), \\ \frac{dy_3^{m34}}{dt} &= c_1^{m34} + c_2^{m34} f(y_1(t - \tau_2), y_3^{m34}(t - \tau_2), k_p^{m34}) - c_3^{m34} y_3^{m34}(t), \\ \frac{dy_3^{m192}}{dt} &= c_1^{m192} + c_2^{m192} f(y_1(t - \tau_2), y_3^{m192}(t - \tau_2), k_p^{m192}) - c_3^{m192} y_3^{m192}(t), \\ \frac{dy_3^{m194}}{dt} &= c_1^{m194} + c_2^{m194} f(y_1(t - \tau_2), y_3^{m194}(t - \tau_2), k_p^{m194}) - c_3^{m194} y_3^{m194}(t), \\ \frac{dy_3^{m215}}{dt} &= c_1^{m215} + c_2^{m215} f(y_1(t - \tau_2), y_3^{m215}(t - \tau_2), k_p^{m215}) - c_3^{m215} y_3^{m215}(t), \\ \frac{dy_4}{dt} &= d_1 g(y_1(t - \tau_4), y_4(t - \tau_4), k_b, d_3) - d_2 y_4. \end{aligned}$$

Здесь y_1, y_2, y_4 — уровни белков p53, Mdm2 и p21; y_3 — уровни микроРНК, причем верхние индексы $m34, m192, m194, m215$ указывают на принадлежность к семействам микроРНК miR-34, miR-192, miR-194, miR-215 соответственно; $N(t)$ — функция, описывающая изменение концентрации нутлина от нулевого значения к постоянному, равному экспериментальному уровню концентрации [17].

Для численного решения обратной коэффициентной задачи, как и прежде, использовался алгоритм ВГА, прямые задачи решались с применением описанного ранее численного алгоритма. Интервалы начальных приближений I_0 в ВГА определялись с учетом сходства постановок задач и данных, полученных на этапе методических расчетов при моделировании условий экспериментов [41] (для дозы нутлина 10 мкмоль/л). Для удобства согласования с экспериментальными данными характерный масштаб времени

полагался равным $T = 1$ мин, а в уравнение динамики Mdm2 вводился дополнительный параметр b_0 , значение которого полагалось весьма малым, близким к нулю. Последнее позволило более точно воспроизвести экспериментальную динамику системы на начальном интервале времени.

Отметим, что представление воздействия нутлина функцией Хилла является общепринятым (см., например, [46]). Другой способ состоит в замене уравнения динамики y_1 в модели 3 уравнением (1) (данная модель будет далее упоминаться как модель 3а) и выборочном изменении параметров этого уравнения. Этот подход снижает количество неизвестных параметров модели, однако явное введение функции $N(t)$ представляется более универсальным и удобным при проведении дальнейших численных экспериментов. Как и ожидалось, при использовании модели 3а близость к экспериментальным данным [17] может быть обеспечена только изменением параметра a_2 при сохранении значений остальных параметров модели 3.

На рис. 6 представлены численные решения прямых задач, соответствующих оптимальным наборам параметров моделей 3 и 3а. Видно, что численные решения обеих моделей весьма близки друг к другу и хорошо согласуются с экспериментальными данными [17]. Можно предположить, что это согласование основано на том, что в рамках лабораторного эксперимента уровень нутлина был достаточно высок, чтобы обеспечить не только нужную реакцию биологической системы, но и слабую зависимость результатов от режима воздействия нутлином. При воздействии нутлина полученные в расчетах кинетические кривые демонстрируют состояние активации и выхода на более высокий постоянный уровень p53 и связанных с ними белка p21 и микроРНК miR-34, miR-192, miR-194, miR-215 на фоне весьма низкого уровня Mdm2. Предпринималась также попытка оценить влияние нутлина на динамику биологической системы по отношению к исходному состоянию в клетках множественной миеломы. Численный эксперимент показал, что при $N(t) = 0$ численные решения демонстрируют более низкие уровни p53, микроРНК, p21 и более высокий уровень Mdm2, чем при воздействии нутлина. Наблюдаемые тенденции соответствуют известным представлениям о функционировании сигнального пути p53 в раковой клетке с p53 дикого типа (см., например, [5, 17]). Отметим также, что модель и генетический алгоритм ВГА достаточно хорошо выявляют особенности кинетики разных микроРНК, которые были зафиксированы в ходе лабораторных измерений [17]: все рассматриваемые микроРНК оказались весьма чувствительными к воздействию нутлина, причем реакция miR-34a была наиболее выраженной. Дополнительно для приближенной (в рамках принятой модели) оценки вклада конкретного семейства микроРНК в подавление Mdm2 были проведены численные эксперименты, в которых рассматривалось поочередное или попарное воздействие с участием каждого из четырех микроРНК. Расчеты показали, что в рамках модели 3 совместное влияние miR-34a и miR-215 приводит систему в состояние, близкое к наблюдаемому в экспериментах [17].

Синергический эффект. Результаты анализа совместной динамики уровней p53, микроРНК и Mdm2, которую демонстрируют данные лабораторных [17] и численных экспериментов (при оптимальных значениях параметров), могут служить иллюстрацией гиперактивации пути p53 под воздействием нутлина как синергического эффекта. Численные эксперименты, позволяющие глубже понять механизм гиперактивации пути p53, проводились в несколько этапов. В качестве “исходного” состояния рассматривалось то, которое было получено при $N(t) = 0$ и $b_3^{m34} = b_3^{m192} = b_3^{m194} = b_3^{m215} = b_3^m = 0$ (результат представлен семейством фазовых траекторий 1 на рис. 7), а “финальным”

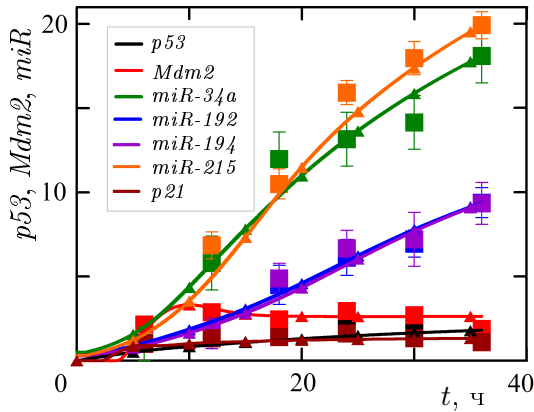


Рис. 6. Динамика системы $p53 - Mdm2 - miR-34a - miR-192 - miR-194 - miR-215 - p21$ в раковой клетке под воздействием нутлина: *квадраты* — экспериментальные данные [17]; *сплошные линии* — модель 3 при оптимальных значениях параметров Opt [17]; *линии, маркированные треугольниками* — модель 3а. Представление данных согласовано с принятым в [17]

Fig. 6. Dynamics of the $p53 - Mdm2 - miR-34a - miR-192 - miR-194 - miR-215 - p21$ system in a cancer cell under the influence of nutlin: *squares* — experimental data [17]; *solid lines* — model 3 at optimal values of parameters Opt [17]; *lines marked with triangles* — model 3a. The data representation is consistent with that adopted in [17]

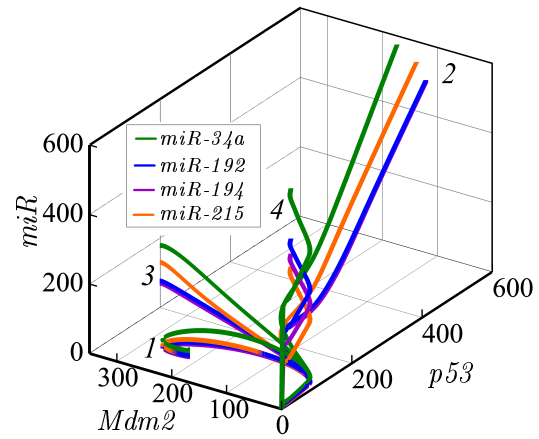


Рис. 7. Синергический эффект гиперактивации пути $p53$ в эксперименте [17], полученный в рамках модели 3 при варьировании параметров Opt [17]: 1 — при отсутствии нутлиновой терапии и воздействия микроРНК на $Mdm2$, 2 — совместное воздействие нутлина и микроРНК (синергия), 3 — нутлиновая терапия без учета микроРНК, 4 — активация микроРНК при отсутствии нутлина

Fig. 7. The synergistic effect of hyperactivation of the $p53$ pathway in the experiment [17], obtained within the framework of model 3 with varying parameters Opt [17]: 1 — in the absence of nutlin therapy and the effect of microRNA on $Mdm2$, 2 — joint effect of nutlin and microRNA (synergy), 3 — nutlin therapy without microRNA, 4 — activation of microRNA in the absence of nutlin

считалось состояние, полученное с учетом всех воздействий при оптимальном наборе параметров, т. е. согласованное с условиями лабораторного эксперимента [17] (семейство траекторий 2 на рис. 7). Воздействие заданной дозы нутлина (10 мкмоль/л), при котором исключается влияние сразу всех микроРНК ($b_3^m = 0$), хотя и изменяет динамику системы, но все же приводит к весьма умеренной активации сигнального пути $p53$ (рис. 7, траектории 3). На рис. 7 (траектории 4) видно, что при отсутствии нутлина активация микроРНК до уровня, близкого к полученному при $b_3^m = b_3^{Opt}$ с учетом воздействия нутлина, имела тот же эффект (в этом эксперименте полагалось $c_1 = 20c_1^{Opt}$). Этот численный эксперимент показывает, что в рамках принятой математической модели в условиях, приближенных к условиям лабораторного эксперимента [17], ингибирующего воздействия на $Mdm2$ со стороны микроРНК недостаточно для гиперактивации $p53$ и микроРНК (это относится ко всем четырем рассмотренным микроРНК). И точно так же малоэффективным оказывается воздействие нутлина в случае отсутствия влияния микроРНК на $Mdm2$. Представленные результаты численных экспериментов указывают на то, что синергический эффект совместного воздействия нутлина и микроРНК является (в рамках принятой модели) одним из ключевых механизмов, обеспечивающих гиперактивацию петли положительной обратной связи $p53 - микроРНК$ в экспериментах [17]. Таким образом, $p53$ -зависимые микроРНК могут играть одну из центральных ролей в повышении эффективности противораковой терапии.

5. Численный анализ функционирования сигнального пути p53 в патологических процессах, связанных с массовой гибелью клеток

5.1. Ингибирование Sirt1 при оксидативном стрессе в эпителиальных клетках дыхательных путей при ХОБЛ

Преждевременное старение легких, возникающее, как полагают, в результате длительного воздействия неблагоприятных факторов среды и образа жизни (к ним относятся, в частности, загрязнение воздуха и курение), является одним из признаков патогенеза хронического воспалительного заболевания легких (ХОБЛ) — одного из наиболее распространенных прогрессирующих заболеваний органов дыхания. Оксидативный стресс считается одним из ключевых факторов в инициации клеточного старения, которые отягощают патогенез ХОБЛ и многих других хронических заболеваний. При ХОБЛ эндогенный окислительный (оксидативный) стресс возникает в результате высвобождения токсичных активных форм кислорода и азота из воспалительных (иммунных) клеток и структурных клеток легких и усиливается за счет нарушения эндогенной антиоксидантной защиты.

Известно, что клеточное старение и ингибирование антиоксидантных генов регулируются белками p53, p21 и Sirt1, однако наибольший интерес у исследователей вызывает оценка регуляторной функции микроРНК как одной из возможных терапевтических целей при ХОБЛ. В настоящей работе для демонстрации значимой роли p53-зависимых микроРНК используются данные лабораторных экспериментов [23], в рамках которых на клетках линии BEAS2B показано, что зависимая от окислительного стресса активация микроРНК miR-34a снижает экспрессию Sirt1 — еще одного белка-ингибитора p53. Чтобы оценить влияние окислительного стресса на экспрессию miR-34a и Sirt1, в экспериментах [23] иммортализованные эпителиальные клетки бронхов человека (BEAS2B) обрабатывали в течение 48 ч перекисью водорода H_2O_2 — одним из высокотоксичных свободных радикалов. Исследования *in vitro* и анализ тканей легких при ХОБЛ показали (см., например, [48]), что, по-видимому, окислительный стресс вызывает активацию микроРНК через активацию p53.

Модель 4. Для описания функционирования системы p53 — Sirt1 — miR-34a использовалась базовая математическая модель 1, адаптированная в соответствии с содержательным смыслом задачи:

$$\begin{aligned}\frac{dR}{dt} &= k_1 + k_2 \frac{y_1}{y_1 + k_3} R - k_4 R, \\ \frac{dy_1}{dt} &= a_1 + \frac{a_{1R} R}{R + a_{2R}} - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \\ \frac{dy_2}{dt} &= b_0 + b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t) - b_3 f(y_2(t - \tau_3), y_3(t - \tau_3), k_m), \\ \frac{dy_3}{dt} &= c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t).\end{aligned}$$

Здесь y_1, y_2 — уровни белков p53 и Sirt1; y_3 — уровень miR-34a; R — уровень оксидативного стресса. Параметр k_1 отражает усиление оксидативного стресса из-за превышения физиологически допустимого уровня высокотоксичных активных форм кислорода и

азота, воспалительных и других факторов патогенеза ХОБЛ; в модели в наиболее общем виде учитываются процессы утилизации факторов стресса; особое место отводится усилению оксидативного стресса при активации p53 [23]. При $k_1 = 0$ модель 4 описывает систему при отсутствии оксидативного стресса (состояние условной нормы) и совпадает с базовой моделью 1. Как и ранее, начальные условия задаются согласованными с условиями лабораторных экспериментов; $T = 1$ мин.

Решение задачи проводилось с применением описанного выше численного алгоритма, включающего в себя поиск оптимальных значений параметров генетическим алгоритмом BGA и численное решение прямых задач методом предиктор-корректор второго порядка, а также экономичной вычислительной технологии расщепления, детально описанной в [37]. При этом на этапе подготовки данных дефицит экспериментальной информации восполнялся за счет промежуточных значений, полученных в результате интерполяции кубическим сплайном. Конкретная реализация технологии расщепления обратной коэффициентной задачи с большим числом неизвестных параметров μ состояла в следующем: на первом этапе определялись параметры первых трех уравнений модели 4, при этом численное решение уравнения динамики miR-34a заменялось в каждой точке расчетной сетки построенным по экспериментальным данным сплайном; после этого часть полученных значений параметров фиксировалась, и на последнем этапе определялись значения параметров a_{1R} , a_{2R} , k_2 , c_1 , c_2 , k_p , c_3 , τ_2 , причем часть из них только уточнялась после объединения системы и отказа от использования сплайнов.

Численное решение прямой задачи, соответствующее условиям эксперимента [23] при ХОБЛ и оптимальному набору параметров Opt [23], демонстрирует рис. 8. Экспериментальные данные, иллюстрирующие динамику miR-34a и Sirt1, помечены маркерами. Здесь же показано решение, описывающее состояние системы p53 — Sirt1 — miR-34a при отсутствии оксидативного стресса ($k_1 = 0$). Отметим, что для наглядности данные для miR-34a на рис. 8 представлены с использованием дополнительного нормирующего множителя; кроме того, ввиду отсутствия экспериментальных измерений для p53 нормировка компоненты численного решения y_1 принималась согласованной с относительным изменением y_3 . Можно видеть, что численное решение достаточно хорошо

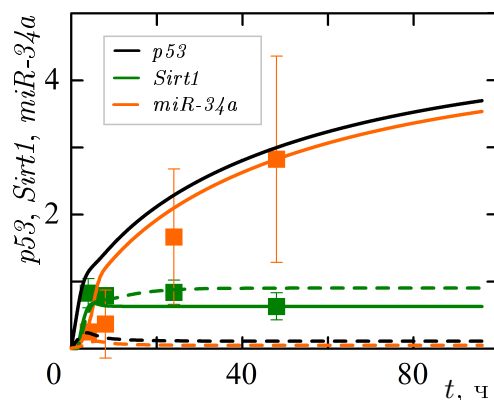


Рис. 8. Динамика системы p53 — Sirt1 — miR-34a в immortalized эпителиальных клетках бронхов человека (BEAS2B) после обработки перекисью водорода H_2O_2 : *маркеры* — экспериментальные данные [23]; *сплошные линии* — модель 4 с параметрами Opt [23]; *штриховые линии* — модель 4 при $k_1 = 0$ (отсутствие оксидативного стресса)

Fig. 8. Dynamics of the p53 — Sirt1 — miR-34a system in immortalized human bronchial epithelial cells (BEAS2B) after treatment with hydrogen peroxide H_2O_2 : *markers* — experimental data [23]; *solid lines* — model 4 at parameters Opt [23]; *dashed lines* — model 4 at $k_1 = 0$ (no oxidative stress)

согласуется с экспериментальными данными по динамике Sirt1 и miR-34a. В частности, численное решение хорошо описывает кратковременное повышение уровня Sirt1, которое отмечалось также в лабораторном эксперименте через 4 ч после воздействия. Видно, что при достаточно высокой концентрации перекиси (100 мкмоль/л), инициирующей оксидативный стресс, со временем наблюдаются существенный рост уровня p53 и miR-34a и снижение уровня Sirt1. Таким образом, результаты численных экспериментов согласуются с выводами, основанными на лабораторных исследованиях, в том, что окислительный стресс модулирует экспрессию как Sirt1, так и miR-34a в эпителиальных клетках бронхов.

5.2. Дегенеративные процессы при фиброзе печени у крыс: роль пути p53 — miR-34a

Фиброз печени — патологически сверхвыраженный процесс заживления хронической раны, характеризующийся образованием избыточного количества соединительной ткани в виде рубцов, которые замещают нормальную ткань печени и способствуют тем самым утрате естественных функций этого органа. Известно, что следствием хронического повреждения печени является массовый апоптоз основных клеток ткани печени — гепатоцитов, а защита гепатоцитов от апоптоза является одним из важных методов снижения уровня повреждения клеток печени. Экспериментально установлено, что именно сигнальный путь miR-34a — Sirt1 — p53 активируется при фиброзе печени, играя важную роль в апоптозе гепатоцитов, и, следовательно, он может быть перспективной терапевтической мишенью.

Некоторые количественные данные представлены в работе [49]. В этом лабораторном эксперименте фиброз печени крыс инициировали внутрибрюшинным введением препарата CCL_4 (0.2 мл/кг). Цитотоксический эффект гепатотоксинов, таких как CCL_4 , основан на том, что они вызывают образование активных форм кислорода и азота в гепатоцитах, что приводит к оксидативному стрессу и массовой гибели этих клеток (см. также [50]). Характерное время развития фиброза у такой лабораторной модели составляет несколько недель.

В [49] продемонстрирована активация проапоптозного сигнального пути p53 в гепатоцитах, а наиболее интересным наблюдением, как и в [23], является сверхэкспрессия miR-34a. Ранее отмечалось, что задействованный в этом процессе сегмент p53 — Sirt1 — miR-34a сигнального пути p53 функционирует таким образом, что формируется петля положительной обратной связи, в которой p53 индуцирует miR-34a, а miR-34a активирует p53 через ингибирование Sirt1. Дополнительно отметим, что Sirt1 способен ингибировать p53 через сложные механизмы деацетилирования p53 (в [49] общий уровень p53 оставался неизменным во все время наблюдений). Известно [51], что p53 становится ацетилированным после повреждения ДНК и что ацетилированная форма p53 обладает повышенной транскрипционной и рядом других активностей. Sirt1 взаимодействует и деацетилюет p53. В клетках, подвергнутых повреждению ДНК, ингибирование Sirt1 может приводить к увеличению ацетилирования p53. Учитывая все это, для математического моделирования динамики системы p53 — Sirt1 — miR-34a привлекалась модель 4, в которой y_1 — уровень ацетилированной (активной) формы белка p53, а смысл остальных переменных модели остается тем же, что и в подразд. 5.1.

Численное решение прямых и обратных коэффициентных задач проводилось по технологии, описанной в подразд. 5.1. В данной серии численных экспериментов характер-

ный масштаб времени $T = 1$ ч определялся условиями лабораторного эксперимента [49]. Численные решения моделей 1 и 4 и соответствующие экспериментальные данные представлены на рис. 9. Можно видеть согласованность результатов математического моделирования и экспериментальных данных [49]. Под влиянием оксидативного стресса уровни p53 и микроРНК возрастают с течением времени, при этом уровень Sirt1 снижается относительно нормы (примерно на 18–25%), что согласуется с лабораторными наблюдениями [49].

Численный анализ решения, полученного при оптимальных значениях параметров модели 4, свидетельствует о сверхактивации сигнального пути p53 в ответ на оксидативный стресс. Для более тщательного рассмотрения этого эффекта на рис. 10 представлен фазовый портрет численных решений при наличии оксидативного стресса (соответствует условиям и результатам лабораторного эксперимента [49]) и при его отсутствии (норма). Здесь же показаны фазовые траектории, описывающие состояние системы p53 — Sirt1 — miR-34a под влиянием оксидативного стресса, но при существенно ослабленном влиянии miR-34a на Sirt1 ($b_3 = 0.06b_3^{Opt}$). Эти данные наглядно демонстрируют синергию, обусловленную сверхактивацией положительной обратной связи p53 — miR-34a, которая вызывается оксидативным стрессом под контролем микроРНК. Кроме того, видно, что ослабление ингибирующего воздействия miR-34a на Sirt1 приводит к росту уровня Sirt1, который сдерживает чрезмерную активацию p53 и микроРНК.

Таким образом, анализ результатов численных экспериментов подтверждает гипотезу, выдвинутую на основе лабораторных исследований [49]: сигнальный путь p53 и микроРНК miR-34a могут рассматриваться в качестве перспективной терапевтической мишени при фиброзе печени.

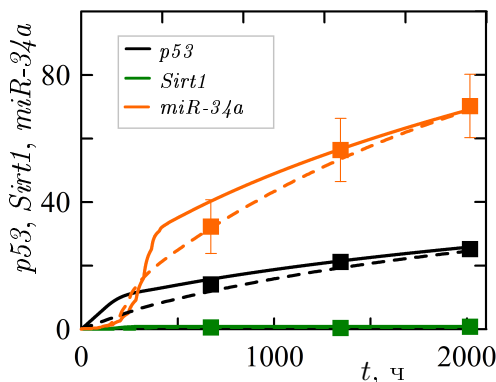


Рис. 9. Динамика системы p53 — Sirt1 — miR-34a в гепатоцитах крыс после введения препарата CCL_4 (инициация фиброза печени): *маркеры* — экспериментальные данные [49]; *сплошные линии* — модель 4; *штриховые линии* — модель 1
Fig. 9. Dynamics of the p53 — Sirt1 — miR-34a system in rat hepatocytes after treatment with the drug CCL_4 (initiation of liver fibrosis): *markers* — experimental data [49]; *solid lines* — model 4; *dashed lines* — model 1

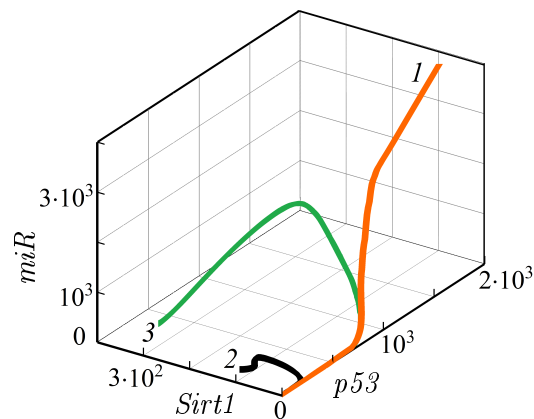


Рис. 10. Фазовые траектории численных решений, описывающих динамику системы p53 — Sirt1 — miR-34a в гепатоцитах крыс: 1 — при наличии оксидативного стресса, 2 — при отсутствии оксидативного стресса (условная норма), 3 — при наличии оксидативного стресса и ослаблении влияния miR-34a на Sirt1
Fig. 10. Phase trajectories of numerical solutions describing the dynamics of the p53 — Sirt1 — miR-34a system in rat hepatocytes: 1 — in the presence of oxidative stress, 2 — in the absence of oxidative stress (conditional norm), 3 — in the presence of oxidative stress and the reduction of the influence of miR-34a on Sirt1

5.3. Активация пути р53, ассоциированная с синдромом Дауна

Синдром Дауна (СД) — это генетическое нарушение, характерными признаками которого являются снижение когнитивных функций мозга и существенная потеря нейронов в гиппокампе и других отделах головного мозга. Имеется достаточно много свидетельств в пользу того, что повышенная готовность нейронов к самоуничтожению через запуск программы апоптоза является результатом множества нарушений в функционировании клеточно-молекулярных механизмов внутри нейронов и в паренхиматозном пространстве мозга. К наиболее значимым факторам, инициирующим гиперактивацию сигнального пути р53 при синдроме Дауна, относят оксидативный стресс, хроническое нейровоспаление, а также ранние молекулярно-клеточные признаки болезни Альцгеймера — все они существенно повышают восприимчивость нейронов к апоптозу (см., например, [52, 53]). Одной из наиболее удачных и распространенных лабораторных моделей СД считаются трансгенные мыши линии Ts65Dn, которые имеют многие признаки, вполне сравнимые с фенотипическими проявлениями синдрома Дауна у человека, включая типичные проблемы обучения и памяти, нейроанатомические и другие характеристики [54]. В детальных лабораторных экспериментах [52] было показано, что активация апоптоза при синдроме Дауна в иммортализованных клетках мозга человека и в мозге трансгенной мыши линии Ts65Dn ассоциирована именно с активацией проапоптозного сигнального пути р53 — Sirt1 — Вах.

Для описания динамики сигнального пути р53 — Sirt1 — Вах, наблюдаемой в лабораторных экспериментах [52], привлекается модель 4, которая дополняется уравнением динамики уровня Вах:

$$\frac{dy_4}{dt} = d_0 + d_1 f(y_1(t - \tau_4), y_4(t - \tau_4), k_b, d_3) - d_2 y_4(t).$$

В данном варианте модели y_1 — уровень активной (ацетилированной) формы белка р53, y_2 — уровень Sirt1, y_3 — уровень miR-34a, y_4 — уровень белка Вах, R — уровень оксидативного стресса. В этой серии численных экспериментов характерный масштаб времени T , как и ранее, определялся условиями соответствующего лабораторного эксперимента и полагался равным 24 ч.

На рис. 11 представлены результаты решения прямой задачи, соответствующей оптимальному набору параметров, полученному по той же технологии, что и в подразд. 5.1. Можно видеть, что результаты математического моделирования достаточно хорошо согласуются с динамикой системы р53 — Sirt1 — Вах, наблюдаемой в лабораторном эксперименте [52] у мышей Ts65Dn. Как и в [52], в численных экспериментах отмечается увеличение уровня активного р53 при сниженном уровне Sirt1. При этом активация белка р53 вызывает активацию его нисходящей мишени белка Вах. В связи с этим в [52] предполагают, что р53 способен интегрировать различные сигналы, что может привести к активации апоптозного р53-зависимого сигнального пути и способствовать развитию характерной для болезни Альцгеймера невропатологии у пациентов с синдромом Дауна.

Одним из наиболее важных представляется вопрос о возможной роли р53-зависимых микроРНК, регулирующих Sirt1, в процессе нейродегенерации. Моделирование осуществлялось в предположении, что динамика микроРНК в данном патологическом процессе сходна с динамикой miR-34a при оксидативном стрессе, вызывающем повреждение и смерть клеток печени и легких (см. подразд. 5.1 и 5.2). На рис. 11, 12 представлены кинетические кривые и фазовые портреты состояний системы р53 — Sirt1 — miR, полученные при ослаблении ингибирующего влияния микроРНК на Sirt1 (этот эффект

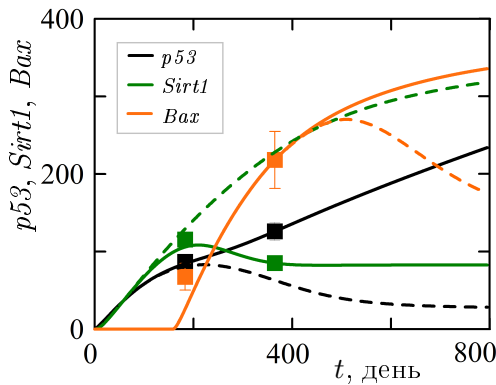


Рис. 11. Динамика системы $p53 - Sirt1 - Bax$ в клетках мозга трансгенных мышей Ts65Dn. *Маркеры* — экспериментальные данные [52], *сплошные линии* — модель 4, *штриховые линии* — модель 4 при $b_3 = 10^{-2}b_3^{Opt}$ (терапевтическое воздействие при ослаблении роли микроРНК)

Fig. 11. Dynamics of the $p53 - Sirt1 - Bax$ system in brain cells of transgenic mice Ts65Dn. *Markers* — experimental data [52], *solid lines* — model 4, *dashed lines* — model 4 at $b_3 = 10^{-2}b_3^{Opt}$ (therapeutic effect in the reduction of the microRNAs role)

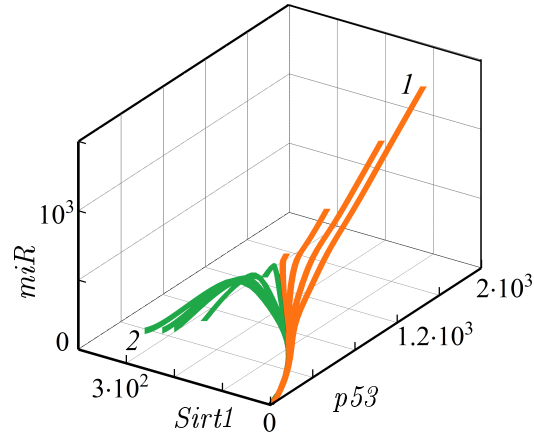


Рис. 12. Фазовые траектории численных решений, описывающих состояния системы $p53 - Sirt1 - miR$ в клетках мозга трансгенных мышей Ts65Dn при постепенном ослаблении ингибирующего влияния микроРНК на Sirt1: 1 — $b_3 = b_3^{Opt}$ (воздействие микроРНК на Sirt1, соответствующее лабораторному исследованию [52]), 2 — $b_3 = 0$ (отсутствие воздействия микроРНК на Sirt1), промежуточные траектории соответствуют $0 < b_3 < b_3^{Opt}$

Fig. 12. Phase trajectories of numerical solutions describing the states of the $p53 - Sirt1 - miR$ system in the brain cells of transgenic mice Ts65Dn in the gradual reduction of the inhibitory effect of microRNA on Sirt1: 1 — $b_3 = b_3^{Opt}$ (effect of microRNA on Sirt1 corresponding to a laboratory study [52]), 2 — $b_3 = 0$ (no effect of microRNA on Sirt1), intermediate trajectories correspond to $0 < b_3 < b_3^{Opt}$

имитировался постепенным уменьшением параметра b_3 от $b_3 = b_3^{Opt}$ до $b_3 = 0$). Можно видеть, что в этих условиях микроРНК работает как переключатель, обеспечивающий эффективное управление системой $p53 - Sirt1$.

Таким образом, результаты численных экспериментов свидетельствуют о том, что микроРНК могут играть важную роль в функционировании сигнального пути $p53$ при оксидативном стрессе, обеспечивая значимый терапевтический эффект, снижающий уровень нейродегенеративных повреждений при синдроме Дауна.

6. Численный анализ надежности диагностики дегенеративных заболеваний на основе $p53$ -зависимых микроРНК

К настоящему времени углубленные исследования белков, их систем и модифицированных форм в конкретной клетке, ткани или органе в норме и при патологии позволили не только доказать связь практически всех заболеваний с генами человека, но и обнаружить в патологически измененных тканях диспропорцию между ключевыми элементами белковых сетей и тем самым существенно расширить список биологических параметров состояния пациента, которые могут играть роль биомаркеров. Под биологическими маркерами понимают те измеряемые количественно параметры, которые как

индикаторы определяют норму, патологию или результат лекарственной коррекции заболевания [55, 56].

МикроРНК занимают особое место среди потенциальных биомаркеров многих заболеваний, включая рак и нейродегенеративные процессы, в первую очередь — из-за относительной доступности их использования в широкой клинической практике. Результаты широкого круга клинических и лабораторных наблюдений указывают на возможность значимой изменчивости уровней (дерегуляции) микроРНК и существенное влияние этого фактора на течение заболеваний (см., например, [57–59]). Представленные в настоящей работе и многие другие примеры показывают: нормальная реакция системы р53 — miR на стрессовое воздействие состоит в том, что уровни микроРНК, связанных с р53 положительной прямой или обратной связью, снижаются относительно контрольного состояния вслед за р53 и, наоборот, резко возрастают в случае чрезмерного роста р53. Так, в [60] показано, что в раковых клетках дефицит р53 сопровождается снижением экспрессии miR-34, а в [61] приведены данные, демонстрирующие, что miR-34 активируются в той же степени, что и р53 дикого типа. Подобные результаты обычно рассматриваются как свидетельство того, что микроРНК могут заменить р53 в качестве биомаркеров дегенеративных заболеваний. Ниже будут представлены результаты численного и статистического анализа, показывающие (в рамках принятой модели), может ли и при каких условиях наблюдаться сколько-нибудь значимое расхождение в результатах диагностики состояния пациента, основанной на анализе уровня р53-зависимых микроРНК (положительная обратная связь с р53), с диагностикой на основе белка р53.

В данной серии численных исследований будем исходить из того, что сигнальный путь р53 характеризуется тремя типичными состояниями системы р53 — белок-ингибитор, для краткости обозначаемыми здесь и ниже N , C , D : N (от *norm*) — условно нормальный уровень р53; C (от *cancer*) — значимое снижение уровня или активности р53 при повышенном уровне белка-ингибитора (признак затухания процессов гибели клеток, характерный для рака); D (от *degeneration*) — значимое повышение уровня или активности р53 при сниженном уровне белка-ингибитора (признак массовой гибели клеток, характерный для нейродегенеративных и ряда других заболеваний). В согласии со значительной частью биомедицинских исследований будем полагать достоверной диагностику этих состояний на основе анализа уровня р53 (ниже в рамках принятой математической модели будет проведена оценка влияния этой гипотезы на результат статистического анализа). Предполагается, что рассогласованность с этой диагностикой, полученная по результатам анализа микроРНК, должна рассматриваться не только как мера диагностической надежности микроРНК, но и как обоснование для более тщательного изучения роли конкретных р53-зависимых микроРНК в патогенезе дегенеративных заболеваний.

При постановке численных экспериментов дерегуляция микроРНК ассоциировалась не с изменениями в динамике р53, а с возможными незначительными нарушениями в функционировании микроРНК. Их моделирование осуществлялось случайным изменением значений параметров c_1 , c_2 , c_3 и k_p , участвующих в описании динамики микроРНК под влиянием “конститутивных” процессов и взаимодействия р53 — микроРНК, в заданных диапазонах и по нескольким сценариям. Основной сценарий предполагает одновременное изменение всех параметров в заранее определенных “допустимых” интервалах значений, таких что каждое из этих изменений можно считать малозначимым для системы р53 — белок-ингибитор (слабая дерегуляция; представленные ниже данные

относятся к этому сценарию, если это не оговорено особо). Более “радикальные” сценарии предполагали поочередное или одновременное изменение параметров в различных достаточно широких интервалах значений (далее будет упоминаться как умеренная дерегуляция). Важно отметить, что во всех сценариях дерегуляции изменения значений параметров имели следующее ограничение: вызванные ими изменения уровней микроРНК не должны приводить к сколько-нибудь существенному изменению состояния системы р53 — белок-ингибитор.

Очевидно, что при проведении статистического анализа результатов расчетов ключевым является вопрос о границах изменения значений фазовых переменных, определяющих в рамках принятого подхода к моделированию характерные биологические состояния N , C , D системы р53 — микроРНК. Эта задача вызывает затруднение по нескольким причинам, в том числе — из-за дефицита и разномасштабности экспериментальных данных, а также из-за разнообразия известных микроРНК с положительной обратной связью с р53. В настоящей работе задача сводилась к общепринятому определению условных границ состояния нормы N , при выходе за которые уровни р53 и микроРНК считались соответствующими состояниям C или D . Таким образом, для простоты для каждой фазовой переменной нижняя граница состояния N считается верхней границей состояния C , а верхняя граница состояния N — нижней границей состояния D .

Для каждого варианта численного эксперимента проводилось не менее 800 равноценных расчетов задачи Коши со случайным изменением значений параметров в рамках принятого сценария дерегуляции. Поскольку в рассматриваемом диапазоне параметров модели 1–4 имеют только стационарные решения (другие состояния системы подробно обсуждаются в [26, 32]), из полученных пар стационарных значений (y_1, y_3) формировались достаточно представительные выборки. Статистический анализ выборок основывался как на результатах непосредственного подсчета попаданий значений в нужные границы, так и на анализе близких к реальной выборке теоретических распределений (в качестве критерия согласия полученного в расчетах и теоретического распределений использовался критерий Колмогорова). Для проведения статистического анализа использовались инструменты MATLAB (описание и примеры статистических функций MATLAB приведены в [62]).

Оценка результатов дерегуляции микроРНК на основе модельных представлений. На первом этапе исследований (в значительной мере — в методических целях) количественные границы состояний N , C , D системы р53 — микроРНК задавались с использованием разработанного в [25, 63] подхода, основанного на результатах анализа численных решений и некоторых оценочных предположениях, вытекающих из экспериментальных результатов [5, 61]. Подход сводится к характеристизации состояний N , C или D заданием всего трех точек на фазовой плоскости (y_1, y_3) (далее соответствующие этим точкам значения будут обозначены как $p53$ и miR с пометкой, указывающей на состояние N , C и D). Точка $(p53_N, miR_N)$ является наиболее значимой: по договоренности, 40%-ные относительные изменения этих уровней микроРНК и р53 определяют границы состояний N , C , D . Отметим, что представление о 40%-ных ограничениях выработано на основе анализа результатов больших серий предыдущих численных экспериментов, включая сопоставления с экспериментальными данными по трансактивации р53 и микроРНК (см., например, [25, 27]), и подтверждено последующей статистической оценкой доверительных интервалов достаточно представительной выборки, характеризующей слабые изменения фазовых переменных в окрестности со-

стояния условной нормы. Это позволило определить необходимые для моделирования “допустимые”, т. е. не приводящие к дерегуляции, интервалы изменения значений параметров. Отметим, что в рамках данного подхода предполагалось, что для микроРНК рассматриваемого класса возможными различиями свойств и диапазонов характерных значений уровней различных микроРНК можно пренебречь, при этом в конкретных оценках мы ориентировались на данные для наиболее изученного семейства miR-34.

В данной серии численных экспериментов предполагалось, в частности, что характерное состояние нормы N и конкретные значения $p53_N$ и miR_N определяются набором значений параметров (4) и соответствующим ему стационарным решением базовой модели 1. Следует отметить, что выбор $p53_N$ согласуется с оценками [5]. В отношении miR_N следует отметить, что, исходя из достаточно общих рассуждений, принималась гипотеза $p53_N \approx miR_N$ (см. оценки [61] и обсуждение этого вопроса в [25]). Характерные значения $p53$ и микроРНК в состояниях C и D (точки $(p53_C, miR_C)$ и $(p53_D, miR_D)$), которые в дальнейшем использовались при организации численных экспериментов по дерегуляции микроРНК в этих состояниях, с определенной долей произвола задавались варьированием ряда параметров из набора (4).

Чтобы иметь представление о статистической значимости принятых здесь условных границ состояния нормы, проводилась оценка изменения стационарных решений модели 1 в окрестности состояния, определяемого набором параметров (4). Статистический анализ показал, что установленные границы нормы для $p53$ и микроРНК соответствуют примерно 95%-ному доверительному интервалу логнормальных теоретических распределений плотностей вероятностей с параметрами $\mu \approx 5$ и $\sigma \approx 0.194 \dots 0.217$, если близкие к ним распределения получены в расчетах при одновременном случайном изменении значений параметров в 15%-ной окрестности значений (4). Для выборки из значений $p53$ медианное значение $Med_{3200} = 147.008$, интерквартильный размах [128.97, 167.57], 95%-ный доверительный интервал [94.7, 216.75]; для выборки из значений микроРНК медианное значение $Med_{3200} = 151.765$, интерквартильный размах [131.067, 175.73], 95%-ный доверительный интервал определяется значениями [96.25, 234.41]; принятая в данном разделе на основе эмпирических соображений оценка границ нормы [92.78, 216.50] для $p53$ и [93.38, 217.90] для микроРНК.

При реализации основного сценария дерегуляции каждая статистическая выборка формировалась из не менее чем 800 решений задачи Коши. Анализ показал, что рассчитанные плотности распределения вероятностей весьма близки к гамма-распределению в состояниях N и C и нормальному распределению в состоянии D . Это позволило оценить вероятность “ошибочной” диагностики состояния пациента как вероятность выхода характерных значений уровней микроРНК за пределы областей “допустимых” значений: для ситуации N она составляет 0.57, для ситуации C — 0.08, для ситуации D — 0.09. При этом высока вероятность расхождения результатов диагностики рака у условно здоровых (с нормальными показателями уровня $p53$) пациентов, а у пациентов со сниженным или сверхвысоким уровнем $p53$, напротив, весьма высока надежность диагностики на основе микроРНК, которая практически повторяет диагностику, основанную на анализе уровня $p53$. Увеличение объема выборок до 1600 практически не повлияло на статистику. Полученные в этом эксперименте оценки свидетельствуют об удовлетворительных диагностических свойствах микроРНК, поскольку, очевидно, ошибочный диагноз для условно здорового пациента не является критичным в той же мере, что и для больного.

Аналогичным образом оценивались данные, полученные с использованием нескольких вариантов умеренной (т. е. более выраженной, чем в основном сценарии) дерегуля-

ции, различающихся по размеру интервалов изменения одного или всех одновременно параметров c_1 , c_2 , c_3 и k_p ; объем каждой выборки 1200. Результаты статистического анализа показали, что вероятность ошибочной диагностики на основе микроРНК в ситуации с условно нормальным уровнем р53 могла достигать значений 0.4–0.65, а в наиболее опасных состояниях она резко возрастает (по сравнению с основным сценарием дерегуляции), достигая 0.22–0.5 в случае риска развития рака и 0.15–0.5 в случае угрозы развития дегенеративных процессов из-за высокого уровня р53. Подробное описание этих численных экспериментов можно найти также в [63].

Представляет интерес вопрос о влиянии дополнительных малых возмущений р53 на полученные оценки надежности диагностического потенциала микроРНК. В методических целях в рамках одного из вариантов умеренной дерегуляции микроРНК возмущение р53 моделировалось как одновременное случайное изменение значений параметров a_1 , a_2 , a_3 (не более чем на 15% при анализе состояний N и D и на 25% — состояния C). Во всех случаях возмущения р53 не попадали под принятое определение дерегуляции, т. е. не допускался выход значений р53 за пределы обозначенных границ характерных состояний биологической системы. Объем выборок составлял 1600 элементов для каждого состояния N , C , D в каждой серии расчетов. Некоторые результаты численных расчетов с учетом дополнительного возмущения р53 и без него представлены на рис.13. Оценки вероятности рассогласования показаний на основе р53 и микроРНК при относительно слабом возмущении р53 и без возмущения различаются не более чем на 1.5–2%.

Следует отметить, что все представленные результаты имеют отношение к такой системе р53 — ингибитор — микроРНК довольно общего вида, в рамках которой регуляторная функция микроРНК выражена слабо ($b_3 = b_3^0$ определяется набором параметров (4)). Поэтому дополнительно проводилось исследование диагностических свойств микроРНК с более сильным отрицательным воздействием на белок-ингибитор р53 (при $b_3 = 10b_3^0$). Анализ данных (объем каждой выборки составляет 1600), полученных при моделировании умеренной дерегуляции микроРНК, показал следующее: у пациентов с нормальными показателями уровня р53 вероятность “ошибочной” диагностики, основанной на микроРНК, составляет около 0.7, а у пациентов со сниженным и сверхвысо-

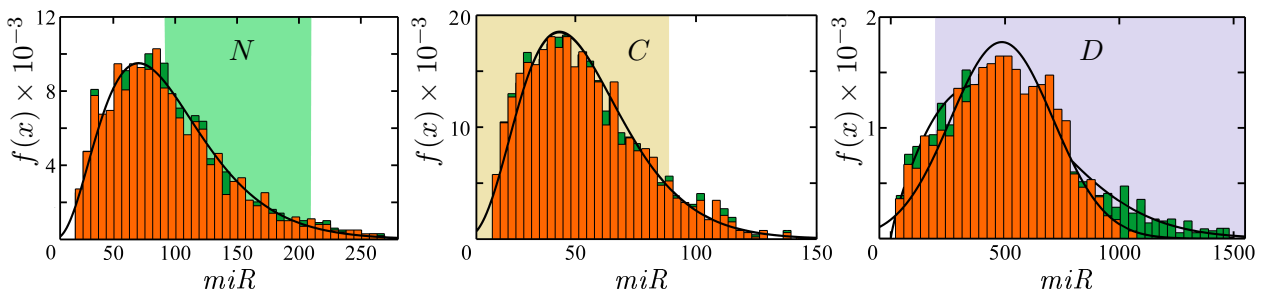


Рис. 13. Плотность распределения вероятностей рассчитанных уровней микроРНК при возмущении р53 (зеленый цвет) и без возмущения (оранжевый цвет) в состояниях N , C и D . Цветными полосами помечены условные области согласованной диагностики на основе микроРНК и р53; сплошные черные линии — теоретические распределения

Fig. 13. Probability density function of calculated microRNA levels with p53 perturbation (green columns) and without perturbation (orange columns) in states N , C and D . Color bars mark conditional areas of consistent diagnostics based on microRNA and p53; solid black lines represent theoretical distributions

ким уровнем p53 — около 0.4 и 0.47 соответственно. Таким образом, при дерегуляции микроРНК с более сильным отрицательным воздействием на белок-ингибитор p53 вероятность диагностической ошибки, которая в рамках принятого подхода определяется мерой доверия к диагностике на основе p53, остается достаточно высокой.

Чтобы подвести общий итог методических исследований, проводился статистический анализ данных, полученных во всех численных экспериментах по дерегуляции микроРНК. Установлено, что при нормальных показателях уровня p53 вероятность “ошибочной” диагностики, основанной на микроРНК, составляет около 0.6 (размер выборки 28 000), при сверхвысоких (размер выборки 26 000) и сниженных уровнях p53 (размер выборки 32 000) — около 0.35 и 0.5 соответственно.

Оценка дерегуляции микроРНК на основе результатов анализа экспериментальных данных. Оценка адекватности результатов методических исследований осуществлялась в два этапа. Сначала предпринималась попытка уточнения условных границ нормы N , риска рака C и риска массовой гибели клеток D на основе анализа представленных в настоящей работе экспериментальных данных [11, 17, 23, 49, 52]. Преимущество этого подхода состоит, очевидно, в том, что все эти данные соответствуют вполне определенным медико-биологическим состояниям системы p53 — микроРНК — ингибитор, причем разные микроРНК достаточно хорошо различимы. Второй этап предполагал применение описанной методологии к анализу диагностической надежности конкретных микроРНК из предыдущих разделов настоящей работы.

Для уточнения условных границ состояний N , C и D на рис. 14 представлены результаты всех серий численных экспериментов, выполненных в настоящей работе (данные приведены в обезразмеренном виде без использования принятой в экспериментальных работах нормировки). Маркерами одинакового цвета отмечены состояния системы p53 — микроРНК, связанные с одним и тем же лабораторным экспериментом: квадрат — стационарное решение при оптимальном наборе параметров, воспроизводящее условия эксперимента, кружок — связанное с ним моделируемое состояние, предшествующее экспериментальному воздействию; треугольники демонстрируют полученные в расчетах промежуточные состояния системы p53 — микроРНК. Анализ этих данных позволяет более обоснованно очертить границы зоны условной нормы N , согласованные, в первую очередь, с условиями проведения лабораторных экспериментов, включая оценки [5]. Уточненные границы показаны линиями разного цвета, поскольку в рамках принятого в работе подхода к моделированию получен определенный разброс в уровнях микроРНК, особенно это касается miR-16. Одновременно нельзя не отметить согласованность данных для miR-34a, полученных в разных биологических процессах.

На рис. 14 представлены также результаты предыдущей серии методических расчетов (черные точки — выборки, полученные по основному сценарию дерегуляции, серые — выборки, полученные при умеренной дерегуляции микроРНК с возмущением p53). Можно видеть, что границы состояний N , C и D , принятые на этапе методических расчетов (штриховые линии), согласуются не только с оценками [5], но и с оценками, полученными при численном анализе условий лабораторных экспериментов [11] (состояния C и D), [17] (состояния C и D), [23, 49, 52] (состояния N и D). Видно также, что все рассмотренные микроРНК, кроме miR-16, могут оцениваться с тех же позиций, что и микроРНК miR-34 (именно этот подход принимался в методической части исследований дерегуляции). А для miR-16 границы характерных состояний должны, по-видимому, уточняться с использованием более широкого круга лабораторных экспериментов. Статистический анализ полученных ранее выборок с привлечением

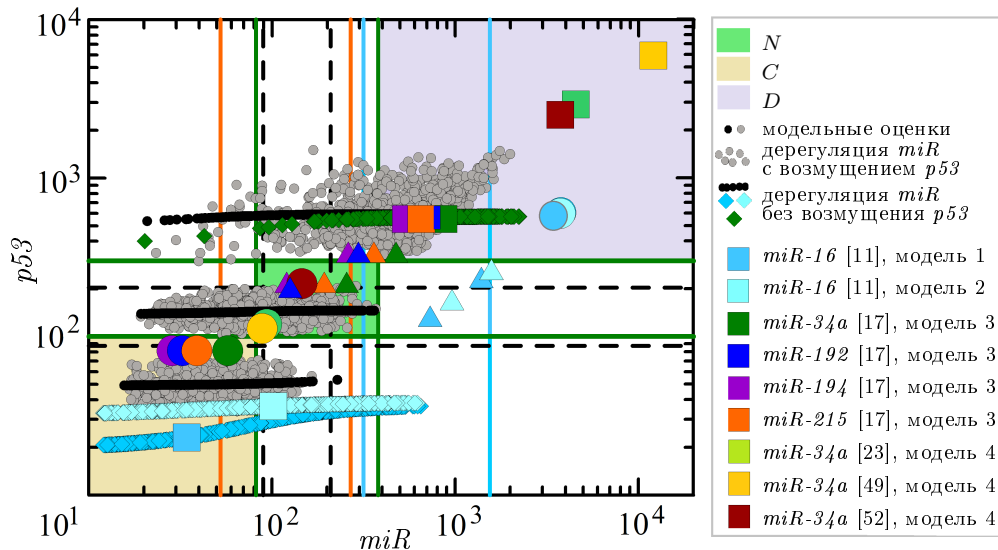


Рис. 14. Характерные значения численных решений: *квадраты* — моделирование условий лабораторных экспериментов; *круги* — моделирование терапевтических воздействий [11, 52], состояния до воздействия нутлином [17] и до оксидативного стресса [23, 49]; *треугольники* — промежуточные состояния. Статистические выборки: *точки* — методические расчеты; *полые квадраты* — слабая дерегуляция miR-34a в условиях [17] и miR-16 в условиях [11]. Границы условной нормы для уровней p53 и различных микроРНК: *сплошные линии* — анализ с привлечением экспериментальных данных, *штриховые линии* — оценки, используемые в методических расчетах

Fig. 14. The characteristic values of numerical solutions: *squares* — simulation of laboratory experiment conditions; *circles* — simulation of therapeutic effects [11, 52], states before treatment with nutlin [17] and before oxidative stress [23, 49]; *triangles* — intermediate states. Statistical samples: *points* — methodical calculations; *hollow squares* — weak deregulation of miR-34a in conditions [17] and miR-16 in conditions [11]. Boundaries of the conditional norm for p53 levels and various microRNAs: *solid lines* — analysis using experimental data, *dashed lines* — estimates used in methodological calculations

уточненных (на примере miR-34a) границ состояний N , C , D показал, что вероятность “ошибочной” диагностики при дерегуляции микроРНК по-прежнему остается высокой (рис. 14).

Представленные выше численные эксперименты рассматривают дерегуляцию микроРНК с довольно общих позиций. Вместе с тем представляет интерес анализ вариантов дерегуляции конкретных микроРНК в условиях, приближенных к наблюдаемым в лабораторных экспериментах. Так, в рамках модели 3 были исследованы диагностические свойства miR-34a, miR-192, miR-194 и miR-215. Динамика этих микроРНК при активации сигнального пути p53 нутлином в клетках множественной миеломы рассмотрена в подразд. 4.3. Полученный здесь набор оптимальных значений параметров соответствует численному решению, описывающему высокий уровень p53 и микроРНК, которые характерны для состояния D . Это решение и оптимальный набор параметров использовались как основа при моделировании поочередной умеренной дерегуляции одного из четырех рассматриваемых микроРНК. Для каждого микроРНК формировалась статистическая выборка объемом 1200. Результаты статистического анализа показывают, что вероятность ошибочной диагностики по miR-34a составляет 0.2, по miR-192 — 0.3, по miR-194 — 0.58, по miR-215 — 0.3. Отметим, что при слабой дерегуляции miR-34a

вероятность “ошибочной” диагностики по miR-34a составляет около 0.06, что полностью согласуется с методическими оценками.

В подразд. 4.2 получен набор оптимальных значений параметров, при которых базовая модель 1 описывает динамику сигнального пути p53 — Wip1 — miR-16, наблюдаемую в лабораторном эксперименте [11] с раковыми клетками линии U2OS остеосаркомы человека (со сниженным уровнем miR-16), которые подвергались воздействию ионизирующего облучения. На рис. 14 можно видеть, что данные для miR-16 демонстрируют заметные отличия от уровней других рассмотренных микроРНК. Поэтому представляется интересным проанализировать последствия дерегуляции miR-16. Отметим, что, как и ранее, при численной реализации умеренной дерегуляции miR-16 не происходило сколько-нибудь существенного изменения динамики p53, так что p53 оставался на достаточно низком уровне. Статистический анализ показал, что вероятность ошибочной диагностики, основанной на miR-16, составляет около 0.084 при умеренной дерегуляции микроРНК и 0.08 — при слабой. Статистический анализ результатов расчетов, проведенных с использованием модели 2, показал близкие результаты.

Таким образом, результаты анализа численных решений математических моделей динамики системы p53 — ингибитор — микроРНК указывают на то, что надежность микроРНК как маркера дегенеративных заболеваний существенным образом зависит от уровня дерегуляции: при весьма слабой дерегуляции наиболее вероятны рассогласования в диагностике с привлечением p53 и микроРНК у условно здоровых пациентов, а в патологических состояниях рассогласование пренебрежимо мало. Усиление дерегуляции, даже если оно не приводит к существенному изменению функционирования биологической системы p53 — ингибитор — микроРНК, резко повышает вероятность рассогласования в диагностике на основе микроРНК во всех состояниях, включая состояния угрозы рака и дегенерации органов (при фиброзах, ХОБЛ, болезни Альцгеймера и др.). Исследование (в рамках принятой модели и подхода к анализу дерегуляции) диагностического потенциала ряда конкретных микроРНК в условиях, приближенных к условиям лабораторных экспериментов, подтвердило эти выводы.

В связи с полученными здесь оценками надежности микроРНК как биомаркеров рака представляется важным упомянуть об известных данных авторов [59], которые в лабораторных условиях на образцах тканей с признаками различных онкологических новообразований сравнивали результаты цитологического, гистологического анализов и анализа по профилю микроРНК. Хотя направленность анализа существенно отличалась от принятой в настоящей работе, интересно отметить, что метод микроРНК выявил там 77% случаев злокачественных опухолей и достоверность 60% из них подтвердила вторичная независимая экспертиза.

7. Общий анализ результатов численных экспериментов

Представленный в настоящей работе цикл исследований имеет целью продемонстрировать возможности минимальных математических моделей динамики сигнального пути p53 как с точки зрения количественного описания результатов лабораторных экспериментов, так и в качестве надежного инструмента для организации больших серий численных расчетов и статистического анализа. В основе базовой модели лежит простейшая биологическая идеализация сигнального пути p53, в рамках которой ключевую роль играет взаимодействие p53 и белков-ингибиторов p53, а сигнальный путь p53 — микроРНК функционирует по принципу положительной обратной связи. Принятый в

базовой математической модели и ее модификациях уровень идеализации соответствует принятому в описываемых лабораторных экспериментах.

Круг рассмотренных в работе процессов охватывает два важнейших направления биомедицинских исследований, связанных с функционированием сигнального пути р53 и оценкой роли р53-зависимых микроРНК как ключевого регулятора и терапевтической мишени. Первое из них нацелено на анализ противораковых терапевтических стратегий, принудительно активирующих путь р53 для запуска программ клеточного старения и апоптоза раковых клеток, а второе, напротив, — на изучение основных механизмов регуляции пути р53 в дегенеративных процессах, обусловленных оксидативным стрессом и патологической массовой гибелью нормальных клеток. Очевидная связь этих, по сути, противоположных направлений позволяет применять при математическом моделировании один и тот же подход, уточнять общие механизмы и закономерности их функционирования для управления биологической системой в терапевтических целях.

С учетом этого представляется важным рассмотреть приведенные в данной работе результаты математического моделирования в общем контексте, объединив результаты решений обратных задач. На рис. 15 приведена круговая диаграмма, которая демонстрирует полученные с привлечением стохастического генетического алгоритма BGA наборы оптимальных параметров, соответствующие всем рассмотренным задачам. Результаты численных исследований указывают на то, что в описании особенностей функционирования системы р53 — ингибитор — микроРНК в условиях, приближенных к условиям различных лабораторных экспериментов, ключевая роль отводится преимущественно тем параметрам математических моделей, которые регулируют процессы взаимодействия белок — белок и белок — микроРНК.

В ходе численных исследований получены данные, раскрывающие некоторые наиболее общие аспекты функционирования биологической системы р53 — ингибитор — микроРНК и возможные способы управления ею в терапевтических целях. Одним из

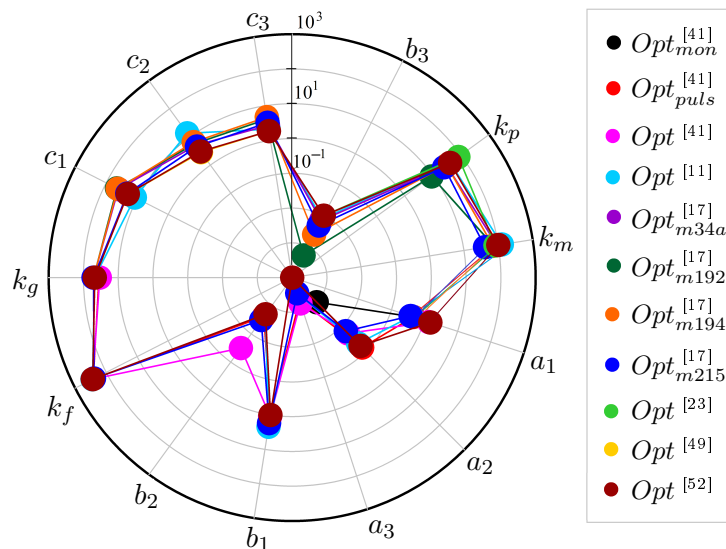


Рис. 15. Диаграмма оптимальных наборов значений параметров математических моделей функционирования сети р53 — ингибитор — микроРНК, полученных при описании лабораторных экспериментов [11, 17, 23, 41, 49, 52]

Fig. 15. Diagram of optimal sets of parameter values for mathematical models of p53 — inhibitor — microRNA network functioning obtained during the description of laboratory experiments [11, 17, 23, 41, 49, 52]

базовых механизмов, характеризующих ответную реакцию пути p53 на стрессовое воздействие, считается бимодальный переключатель: при отсутствии повреждения ДНК петля отрицательной обратной связи между p53 и Mdm2 поддерживает в клетке достаточно низкий уровень p53, а при наличии повреждения происходит переключение системы p53 — Mdm2 на режим с монотонным увеличением p53. Как и в целом ряде экспериментальных работ в рамках принятого подхода к моделированию было продемонстрировано действие другого переключателя, который переводит систему из нормального состояния в состояние с монотонным увеличением белка-ингибитора p53, характерным, в частности, для 50–80 % раковых клеток. Следует отметить, что все указанные состояния наглядно продемонстрированы в лабораторных экспериментах [5] при облучении раковых клеток. Численные эксперименты показывают, что функционирование этих двух переключателей находится под контролем микроРНК по крайней мере одного, рассматриваемого в настоящей работе, класса — с положительной обратной связью с p53.

Численные эксперименты показали также, что механизмом, обеспечивающим гиперактивацию сигнального пути p53 повреждением ДНК, таким как радиация, окислительный стресс и химиотерапевтические препараты, является петля положительной обратной связи p53 — микроРНК. Список микроРНК, находящихся под прямым воздействием p53 и выполняющих роль отрицательного регулятора белков-ингибиторов p53 весьма широк, и работу части из них удалось описать в рамках представленных здесь моделей. С точки зрения уточнения способов управления уровнем активации пути p53 в терапевтических или иных целях наибольший интерес представляет продемонстрированный в ходе анализа результатов лабораторных и численных экспериментов синергический эффект, который, вполне вероятно, является ключом к разгадке основного механизма гиперактивации и в значительной степени обеспечивается регуляторной функцией miR-16, miR-34, miR-192, miR-194, miR-215, а также, по-видимому, и других микроРНК с подобным видом связи с ключевым белком сигнального пути.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что согласно расчетам синергический эффект гиперактивации петли положительной обратной связи p53 — микроРНК представляет собой ключевой фактор патогенеза целого ряда дегенеративных заболеваний, характеризующихся потерей здоровых клеток из-за оксидативного стресса. До определенной степени неожиданно среди заболеваний этого ряда оказался синдром Дауна, при котором значимая часть когнитивных нарушений ассоциируется с негативными последствиями нейровоспаления и оксидативного стресса. Отмена синергического эффекта гиперактивации проапоптозного пути p53 через угнетение регуляторной функции микроРНК, вполне вероятно, может оказаться одним из эффективных способов снижения когнитивных потерь при синдроме Дауна или предотвращения фиброзных повреждений в печени, легких и сердце.

В работе затронута актуальная тема использования различных микроРНК в качестве диагностических биомаркеров дегенеративных заболеваний, среди которых в литературе наиболее часто (в этой связи) упоминается рак. Результаты достаточно общего анализа, полученные в рамках принятого подхода к моделированию и уточненные в ходе исследований данными о конкретных микроРНК в ситуациях, близких к экспериментальным, продемонстрировали, насколько существенно может изменяться результат диагностики на основе микроРНК при относительно слабом нарушении их функционирования.

Таким образом, полученные в ходе численного анализа результаты ясно указывают на особую роль микроРНК как важной терапевтической мишени, позволяющей существенно снизить уровень повреждения здоровой ткани или активировать процесс гибели раковых клеток.

Список литературы

- [1] **Алмазов В.П., Кочетков Д.В., Чумаков П.М.** p53 — инструмент для терапии злокачественных заболеваний человека. Молекулярная биология. 2007; 41(6):947–963.
- [2] **Желтухин А.О., Чумаков П.М.** Повседневные и индуцируемые функции гена p53. Успехи биологической химии. 2010; 50:447–516.
- [3] **Lane D., Levine A.** p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. Cold Spring Harb. Perspect. 2010; 2(12):a000893.
- [4] **Geva-Zatorsky N., Rosenfeld N., Itzkovitz Sh. et al.** Oscillations and variability in the p53 system. Molecular Systems Biology. 2006; 2(1):2006.0033.
- [5] **Batchelor E., Mock C.S., Bhan I., Loewer A., Lahav G.** Recurrent initiation: A mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage. Molecular Cell. 2008; 30(3):277–289.
- [6] **Toettcher J.E., Mock C., Batchelor E., Loewer A., Lahav G.** A synthetic-natural hybrid oscillator in human cells. PNAS. 2010; 107(39):17047–17052.
- [7] **Paek A.L., Liu J.C., Loewer A., Forrester W.C., Lahav G.** Cell-to-cell variation in p53 dynamics leads to fractional killing. Cell. 2016; 165(3):631–642.
- [8] **Jovanovic K.K., Escure G., Demonchy J., Willaume A., Van de Wyngaert Z., Farhat M., Chauvet P., Facon T., Quesnel B., Manier S.** Deregulation and targeting of TP53 pathway in multiple myeloma. Frontiers in Oncology. 2019; 8(3):665.
- [9] **Handa H., Murakami Yu., Ishihara R., Kimura-Masuda K., Masuda Yu.** The role and function of microRNA in the pathogenesis of multiple myeloma. Cancers (Basel). 2019; 11(11):1738.
- [10] **Zhu B., Ju S., Chu H., Shen X., Zhang Y., Luo X., Cong H.** The potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in multiple myeloma. Oncology Letters. 2018; (15):6094–6106.
- [11] **Zhang X., Wan G., Mlotshwa S., Vance V., Berger F.G., Chen H., Lu X.** Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway. Cancer Research. 2010; (70):7176–7186.
- [12] **Issler M.V.C., Mombach J.C.M.** MicroRNA-16 feedback loop with p53 and Wip1 can regulate cell fate determination between apoptosis and senescence in DNA damage response. PLoS ONE. 2017; 12:e0185794.
- [13] **Bommer G.T., Gerin I., Feng Y., Kaczorowski A.J., Kuick R., Love R.E., Zhai Y., Giordano T.J., Qin Z.S., Moore B.B. et al.** p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. Current Biology. 2007; 17:1298–1307.
- [14] **Yamakuchi M., Lowenstein C.J.** MiR-34, SIRT1, and p53: the feedback loop. Cell Cycle. 2009; 8:712–715.
- [15] **Neault M., Couteau F., Bonneau E., De Guire V., Mallette F.A.** Molecular regulation of cellular senescence by microRNAs: implications in cancer and age-related diseases. International Review of Cell and Molecular Biology. 2017; 334:27–98.

- [16] **Zhang J., Sun Q., Zhang Z., Ge S., Han Z.G., Chen W.T.** Loss of microRNA-143/145 disturbs cellular growth and apoptosis of human epithelial cancers by impairing the Mdm2 — p53 feedback loop. *Oncogene*. 2013; 32:61–69.
- [17] **Pichiorri F., Suh S.S., Rocci A., De Luca L., Taccioli C., Santhanam R., Zhou W., Benson D.M.Jr., Hofmainster C., Alder H. et al.** Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell*. 2010; 18:367–381.
- [18] **Fornari F., Milazzo M., Galassi M., Callegari E., Veronese A., Miyaaki H., Sabbioni S., Mantovani V., Marasco E., Chieco P. et al.** p53/mdm2 feedback loop sustains miR-221 expression and dictates the response to anticancer treatments in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer Research*. 2014; 12:203–216.
- [19] **Navarro F., Lieberman J.** miR-34 and p53: New insights into a complex functional relationship. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0132767.
- [20] **Yu J., Baron V., Mercola D., Mustelin T., Adamson E.D.** A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells. *Cell Death and Differentiation*. 2007; 14:436–446.
- [21] **Kato R., Mizuno S., Kadowaki M., Shiozaki K., Akai M., Nakagawa K., Oikawa T., Iguchi M., Osanai K., Ishizaki T. et al.** Sirt1 expression is associated with CD31 expression in blood cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*. 2016; 17:139.
- [22] **Castro R.E., Ferreira D.M.S., Afonso M.B., Borralho P.M., Machado M.V., Cortez-Pinto H., Rodrigues C.M.** miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2013; 58(1):119–125.
- [23] **Baker J.R., Vuppusetty C., Colley T., Papaioannou A.I., Fenwick P., Donnelly L., Ito K., Barnes P.J.** Oxidative stress dependent microRNA-34a activation via *PI3K α* reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells. *Scientific Reports*. 2016; 6:35871.
- [24] **Batchelor E., Loewer A.** Recent progress and open challenges in modeling p53 dynamics in single cells. *Current Opinion in Systems Biology*. 2017; 3:54–59.
- [25] **Воропаева О.Ф., Сенотрусова С.Д., Шокин Ю.И.** Дерегуляция p53-зависимых микроРНК: Результаты математического моделирования. *Математическая биология и биоинформатика*. 2017; 12(1):151–175.
- [26] **Воропаева О.Ф., Лисачев П.Д., Сенотрусова С.Д., Шокин Ю.И.** Гиперактивация сигнального пути p53 — микроРНК: Математическое моделирование вариантов противоопухолевой терапии. *Математическая биология и биоинформатика*. 2019; 14(1):355–372.
- [27] **Сенотрусова С.Д., Воропаева О.Ф.** Математическое моделирование функционирования положительной связи в системе онкомаркеров p53 — микроРНК. *СибЖВМ*. 2019; 22(3):325–344.
- [28] **Kim E., Kim J.-Y., Lee J.-Y.** Mathematical modeling of p53 pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(20):5179.
- [29] **Zhao C., Zhang Y., Popel A.S.** Mechanistic computational models of microRNA-mediated signaling networks in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(2):421.
- [30] **Sun T., Cui J.** A plausible model for bimodal p53 switch in DNA damage response. *FEBS Letters*. 2014; 588:815–821.
- [31] **Tiana G., Jensen M.H., Sneppen K.** Time delay as a key to apoptosis induction in the p53 network. *Eur. Phys. J. B*. 2002; (29):135–140.

- [32] **Воропаева О.Ф., Шокин Ю.И., Непомнящих Л.М., Сенчукова С.Р.** Математическое моделирование функционирования и регуляции биологической системы p53 — Mdm2. М.: Изд-во РАМН; 2014: 176.
- [33] **Воропаева О.Ф., Сенотрусова С.Д.** Переход от уравнения с запаздыванием к системе обыкновенных дифференциальных уравнений в модели сети онкомаркеров. Математическое моделирование. 2017; 29(9):135–154.
- [34] **Goldbeter A., Koshland D.E.** An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. PNAS. 1981; 78:6840–6844.
- [35] **Tyson J.J., Chen K.C., Novak B.** Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. Current Opinion in Cell Biology. 2003; 15:221–231.
- [36] **Мышкис А.Д.** Общая теория дифференциальных уравнений с запаздывающим аргументом. Успехи математических наук. 1949; 4:99–141.
- [37] **Воропаева О.Ф., Цгоев Ч.А.** Численная модель динамики факторов воспаления в ядре инфаркта миокарда. Сибирский журнал индустриальной математики. 2019; 22(2):13–26.
- [38] **Muhlenbein H., Schlierkamp-Voosen D.** Predictive models for the Breeder genetic algorithm. Evolutionary Computation. 1993; 1(1):25–49.
- [39] **Sallaberger M., Fislser M., Michaud M., Eisele K., Casey K.** The design of francis turbine runners by 3D Euler simulations coupled to a breeder genetic algorithm. Proceedings of 20th IAHR Symposium on Hydraulic Machinery and Systems, Aug. 6–9, 2000. Charlotte, North Carolina, USA. 2000: 10.
- [40] **Черный С.Г., Чирков Д.В., Лапин В.Н., Скороспелов В.А., Шаров С.В.** Численное моделирование течений в турбомашинах. Новосибирск: Наука; 2006: 201.
- [41] **Chen X., Chen J., Gan S., Guan H., Zhou Y., Ouyang Q., Shi J.** DNA damage strength modulates a bimodal switch of p53 dynamics for cell-fate control. BMC Biology. 2013; 11: 73.
- [42] **Лихошвай В.А., Фадеев С.И., Демиденко Г.В., Матушкин Ю.Г.** Моделирование уравнением с запаздывающим аргументом многостадийного синтеза без ветвления. Сибирский журнал индустриальной математики. 2004; 7(1):73–94.
- [43] **Воропаева О.Ф., Козлова А.О., Сенотрусова С.Д.** Численный анализ перехода от уравнения с запаздыванием к системе ОДУ в математической модели сети онкомаркеров. Вычислительные технологии. 2016; 21(2):12–25.
- [44] **Оран Э., Борис Дж.** Численное моделирование реагирующих потоков: Пер. с англ. М.: Мир; 1990: 660.
- [45] **Yang R., Huang B., Zhu Y., Li Y., Liu F., Shi J.** Variable sensitivity to DNA damaging chemotherapeutic modulated by cell type-dependent bimodal p53 dynamics. Science Advances. 2018; 4(12):eaat5077. DOI:10.1101/149013.
- [46] **Purvis J.E., Karhohs K.W., Mock C., Batchelor E., Loewer A., Lahav G.** p53 dynamics control cell fate. Science. 2012; 336:1440–1444.
- [47] **Raimondi L., De Luca A., Morelli E., Giavaresi G., Tagliaferri P., Tassone P., Amodio N.** MicroRNAs: Novel crossroads between myeloma cells and the bone marrow microenvironment. BioMed Research International. 2016; 2016:6504593.
- [48] **Climent M., Viggiani G., Chen Y.-W., Coulis G., Castaldi A.** MicroRNA and ROS crosstalk in cardiac and pulmonary diseases. International Journal Molecular Sciences. 2020; 21:4370.

- [49] **Tian X.-F., Ji F.-J., Zang H.-L., Cao H.** Activation of the miR-34a/SIRT1/p53 signaling pathway contributes to the progress of liver fibrosis via inducing apoptosis in hepatocytes but not in HSCs. *PLoS ONE*. 2016; 11(7):e0158657.
- [50] **Farghali H., Kemelo M.K., Kutinova C.N.** SIRT1 modulators in experimentally induced liver injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019:8765954.
- [51] **Solomon J.M., Pasupuleti R., Xu L., McDonagh T., Curtis R., DiStefano P.S., Huber L.J.** Inhibition of SIRT1 Catalytic Activity Increases p53 Acetylation but Does Not Alter Cell Survival following DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*. 2006; 26(1):28–38. DOI:10.1128/MCB.26.1.28-38.2006.
- [52] **Tramutola A., Pupo G., Domenico F.D., Barone E., Arena A., Lanzillotta C., Brokeart D., Blarzino C., Head E., Butterfield D.A., Perluigi M.** Activation of p53 in down syndrome and in the Ts65Dn mouse brain is associated with a pro-apoptotic phenotype. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016; 52(1):359–371.
- [53] **Татарникова О.Г., Орлов М.А., Бобкова Н.В.** Бета-амилоид и тау-белок: Структура, взаимодействие и прионоподобные свойства. *Успехи биологической химии*. 2015; 55(1):351–390.
- [54] **Buckley F.** Modelling Down syndrome. *Down Syndrome Research and Practice*. 2008; 12:98–102.
- [55] **Biomarkers definitions working group.** Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology Therapeutics*. 2001; 69(3):89–95.
- [56] **Мирошниченко И.И., Птицина С.Н.** Биомаркеры в современной медико-биологической практике. *Биомедицинская химия*. 2009; 55(4):425–440.
- [57] **Iorio M.V., Visone R., Leva G., Donati V., Petrocca F., Casalini P., Taccioli C., Volinia S., Liu C.G., Alder H. et al.** MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Research*. 2007; 67:8699–8707.
- [58] **Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Ледин Е.В., Раева Н.Ф., Засухина Г.Д.** Оценка эффективности p53-зависимой системы сохранения стабильности генома по содержанию микроРНК и мРНК в крови онкологических больных. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2015; 60(1):5–14.
- [59] **Titov S.E., Demenkov P.S., Ivanov M.K., Malakhina E.S., Poloz T.L., Tsvilikova E.V., Ganzha M.S., Shevchenko S.P., Gulyaeva L.F., Kolesnikov N.N.** Selection and validation of miRNAs as normalizers for profiling expression of microRNAs isolated from thyroid fine needle aspiration smears. *Oncology Reports*. 2016; 36:2501–2510.
- [60] **Chang T.-C., Wentzel E., Kent O., Ramachandran K., Mullendore M., Lee K.H., Feldmann G., Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C. et al.** Transactivation of miR34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular Cell*. 2007; 26:745–752.
- [61] **Bisio A., De Sanctis V., Del Vescovo V., Denti M.A., Jegga A.G., Inga A., Ciribilli Y.** Identification of new p53 target microRNAs by bioinformatics and functional analysis. *BMC Cancer*. 2013; 13:552.
- [62] **Иглин С.П.** Теория вероятностей и математическая статистика на базе MATLAB. Харьков: НТУ “ХПИ”; 2006: 612.
- [63] **Сенотрусова С.Д.** Влияние дерегуляции p53-зависимых микроРНК на диагностику дегенеративных заболеваний: результаты математического моделирования. Сб. тр. Междунар. науч. конф. “Актуальные проблемы прикладной математики, информатики и механики”. Воронеж: Науч.-иссл. публикации; 2020: 1069–1073.
-

MATHEMATICAL MODELLING

DOI:10.25743/ICT.2020.25.6.002

Application of minimal mathematical models for the dynamics of the signaling pathway of the p53 — miRNA to the analysis of laboratory data

SENOTRUSOVA SOFIA D., VOROPAeva OLGA F.*, SHOKIN YURIY I.

Federal Research Center for Information and Computing Technologies, 630090, Novosibirsk, Russia

*Corresponding author: Voropaeva Olga F., e-mail: vorop@ict.nsc.ru

Received November 2, 2020, revised November 9, 2020, accepted November 16, 2020

Abstract

This study addresses the practical use of minimal mathematical models of the dynamics of a hypothetical system of the p53 signaling pathway to describe a fairly wide range of laboratory experiments. In such system, the interaction of p53 and p53 inhibitor proteins is mediated by microRNAs that form a positive feedback loop with p53. A basic model, new minimal models developed on its basis, an algorithm for the numerical solution of direct and inverse coefficient problems, and the results of comparing the obtained numerical solutions with experimental data on the dynamics of the levels of p53, p21, Bax proteins, inhibitor proteins Mdm2, Wip1, Sirt1, and various microRNAs (miR-16, miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215) under stress conditions are presented.

In numerical experiments, the main mechanisms of the p53 signaling pathway were investigated. A synergistic effect of hyperactivation of the p53 signaling pathway and bimodal switching mechanisms has been demonstrated. We show the key role of p53-dependent microRNAs in the implementation of some hypothetical therapeutic strategies associated with the control mechanism for activation of cells apoptosis. Within the framework of the accepted basic model, we estimated the probability of mismatch in the diagnosis of the patient's status. The status is based on the analysis of the level of p53-dependent microRNAs and p53, with weak and moderate deregulation of microRNAs.

Keywords: mathematical model, numerical analysis, inverse coefficient problem, p53, positive feedback, p21, Bax, Mdm2, Wip1, Sirt1, miR-16, miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215, synergy, bimodal switch, deregulation of microRNA.

Citation: Senotrusova S.D., Voropaeva O.F., Shokin Yu.I. Application of minimal mathematical models for the dynamics of the signaling pathway of the p53 — miRNA to the analysis of laboratory data. Computational Technologies. 2020; 25(6):4–49. DOI:10.25743/ICT.2020.25.6.002. (In Russ.)

References

1. **Almazov V.P., Kochetkov D.V., Chumakov P.M.** Use of p53 for therapy of human cancer. *Molecular Biology*. 2007; 41(6):863–877. (In Russ.)
2. **Zheltukhin A.O., Chumakov P.M.** Everyday and induced functions of the p53 gene. *Advances in Biological Chemistry*. 2010; 50:447–516. (In Russ.)
3. **Lane D., Levine A.** p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb. Perspect.* 2010; 2(12):a000893.
4. **Geva-Zatorsky N., Rosenfeld N., Itzkovitz Sh. et al.** Oscillations and variability in the p53 system. *Molecular Systems Biology*. 2006; 2(1):2006.0033.
5. **Batchelor E., Mock C.S., Bhan I., Loewer A., Lahav G.** Recurrent initiation: A mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage. *Molecular Cell*. 2008; 30(3):277–289.

6. **Toettcher J.E., Mock C., Batchelor E., Loewer A., Lahav G.** A synthetic-natural hybrid oscillator in human cells. *PNAS*. 2010; 107(39):17047–17052.
7. **Paek A.L., Liu J.C., Loewer A., Forrester W.C., Lahav G.** Cell-to-cell variation in p53 dynamics leads to fractional killing. *Cell*. 2016; 165(3):631–642.
8. **Jovanovic K.K., Escure G., Demonchy J., Willaume A., Van de Wyngaert Z., Farhat M., Chauvet P., Facon T., Quesnel B., Manier S.** Deregulation and targeting of TP53 pathway in multiple myeloma. *Frontiers in Oncology*. 2019; 8(3):665.
9. **Handa H., Murakami Yu., Ishihara R., Kimura-Masuda K., Masuda Yu.** The role and function of microRNA in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(11):1738.
10. **Zhu B., Ju S., Chu H., Shen X., Zhang Y., Luo X., Cong H.** The potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in multiple myeloma. *Oncology Letters*. 2018; 15:6094–6106.
11. **Zhang X., Wan G., Mlotshwa S., Vance V., Berger F.G., Chen H., Lu X.** Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway. *Cancer Research*. 2010; 70:7176–7186.
12. **Issler M.V.C., Mombach J.C.M.** MicroRNA-16 feedback loop with p53 and Wip1 can regulate cell fate determination between apoptosis and senescence in DNA damage response. *PLoS ONE*. 2017; 12:e0185794.
13. **Bommer G.T., Gerin I., Feng Y., Kaczorowski A.J., Kuick R., Love R.E., Zhai Y., Giordano T.J., Qin Z.S., Moore B.B. et al.** p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current Biology*. 2007; 17:1298–1307.
14. **Yamakuchi M., Lowenstein C.J.** MiR-34, SIRT1, and p53: the feedback loop. *Cell Cycle*. 2009; 8:712–715.
15. **Neault M., Couteau F., Bonneau E., De Guire V., Mallette F.A.** Molecular regulation of cellular senescence by microRNAs: implications in cancer and age-related diseases. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2017; 334:27–98.
16. **Zhang J., Sun Q., Zhang Z., Ge S., Han Z.G., Chen W.T.** Loss of microRNA-143/145 disturbs cellular growth and apoptosis of human epithelial cancers by impairing the Mdm2 — p53 feedback loop. *Oncogene*. 2013; 32:61–69.
17. **Pichiorri F., Suh S.S., Rocci A., De Luca L., Taccioli C., Santhanam R., Zhou W., Benson D.M.Jr., Hofmainster C., Alder H. et al.** Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell*. 2010; 18:367–381.
18. **Fornari F., Milazzo M., Galassi M., Callegari E., Veronese A., Miyaaki H., Sabbioni S., Mantovani V., Marasco E., Chieco P. et al.** p53/mdm2 feedback loop sustains miR-221 expression and dictates the response to anticancer treatments in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer Research*. 2014; 12:203–216.
19. **Navarro F., Lieberman J.** miR-34 and p53: New insights into a complex functional relationship. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0132767.
20. **Yu J., Baron V., Mercola D., Mustelin T., Adamson E.D.** A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells. *Cell Death and Differentiation*. 2007; 14:436–446.
21. **Kato R., Mizuno S., Kadowaki M., Shiozaki K., Akai M., Nakagawa K., Oikawa T., Iguchi M., Osanai K., Ishizaki T. et al.** Sirt1 expression is associated with CD31 expression in blood cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*. 2016; 17:139.
22. **Castro R.E., Ferreira D.M.S., Afonso M.B., Borralho P.M., Machado M.V., Cortez-Pinto H., Rodrigues C.M.** miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2013; 58(1):119–125.
23. **Baker J.R., Vuppusetty C., Colley T., Papaioannou A.I., Fenwick P., Donnelly L., Ito K., Barnes P.J.** Oxidative stress dependent microRNA-34a activation via *PI3K α* reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells. *Scientific Reports*. 2016; 6:35871.
24. **Batchelor E., Loewer A.** Recent progress and open challenges in modeling p53 dynamics in single cells. *Current Opinion in Systems Biology*. 2017; 3:54–59.

25. **Voropaeva O.F., Senotrusova S.D., Shokin Yu.I.** Deregulation of p53-dependent microRNAs: The results of mathematical modeling. *Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2017; 12(1):151–175. (In Russ.)
26. **Voropaeva O.F., Lisachev P.D., Senotrusova S.D., Shokin Yu.I.** Hyperactivation of the p53-microRNA signaling pathway: Mathematical model of variants of antitumor therapy. *Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2019; 14(1):355–372. (In Russ.)
27. **Senotrusova S.D., Voropaeva O.F.** Mathematical modeling of a positive connection in the p53 — microRNA tumor marker system. *Numerical Analysis and Applications*. 2019; 12(3):270–283. (In Russ.)
28. **Kim E., Kim J.-Y., Lee J.-Y.** Mathematical modeling of p53 pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(20):5179.
29. **Zhao C., Zhang Y., Popel A.S.** Mechanistic computational models of microRNA-mediated signaling networks in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(2):421.
30. **Sun T., Cui J.** A plausible model for bimodal p53 switch in DNA damage response. *FEBS Letters*. 2014; 588:815–821.
31. **Tiana G., Jensen M.H., Sneppen K.** Time delay as a key to apoptosis induction in the p53 network. *Eur. Phys. J. B*. 2002; (29):135–140.
32. **Voropaeva O.F., Shokin Yu.I., Nepomnyashchikh L.M., Senchukova S.R.** A mathematical model for functioning and regulation of p53 — Mdm2 biological system Moscow: RAMS Publ. House; 2014: 176. (In Russ.)
33. **Voropaeva O.F., Senotrusova S.D.** The passage from delay equation to ODE system in the model of the tumor markers network. *Mathematical Modeling*. 2017; 29(9):135–154. (In Russ.)
34. **Goldbeter A., Koshland D.E.** An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *PNAS*. 1981; 78:6840–6844.
35. **Tyson J.J., Chen K.C., Novak B.** Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003; 15:221–231.
36. **Myshkis A.D.** General theory of differential equations with a delayed argument. *Advances in Mathematical Sciences*. 1949; 4:99–141. (In Russ.)
37. **Voropaeva O.F., Tsgoev Ch.A.** A numerical model of inflammation dynamics in the core of myocardial infarction. *Journal of Applied and Industrial Mathematics*. 2019; 13(2):372–383.
38. **Muhlenbein H., Schlierkamp-Voosen D.** Predictive models for the Breeder genetic algorithm. *Evolutionary Computation*. 1993; 1(1):25–49.
39. **Sallaberger M., Fisler M., Michaud M., Eisele K., Casey K.** The design of Francis turbine runners by 3D Euler simulations coupled to a breeder genetic algorithm. In: *Proc. of 20th IAHR Symp. Hydraulic Machinery and Systems*, Aug. 6–9, 2000. Charlotte, North Carolina, USA. 2000: 10.
40. **Cherny S.G., Chirkov D.V., Lapin V.N., Skorospelov V.A., Sharov S.V.** Chislennoe modelirovanie techeniy v turbomashinakh [Numerical modeling of flows in turbomachines]. Novosibirsk: Nauka; 2006: 201.
41. **Chen X., Chen J., Gan S., Guan H., Zhou Y., Ouyang Q., Shi J.** DNA damage strength modulates a bimodal switch of p53 dynamics for cell-fate control. *BMC Biology*. 2013; 11: 73.
42. **Likhoshvai V.A., Fadeev S.I., Demidenko G.V., Matushkin Yu.G.** Modeling nonbranching multistage synthesis by an equation with retarded argument. *Journal of Applied and Industrial Mathematics*. 2004; 7(1):73–94 (In Russ.)
43. **Voropaeva O.F., Kozlova A.O., Senotrusova S.D.** Numerical analysis of the transition from the equation with retarded argument to the ODE system in a mathematical model of the tumor markers network. *Computational Technologies*. 2016; 21(2):12–25. (In Russ.)
44. **Oran E.S., Boris J.P.** Numerical simulation of reactive flow. N.Y.: Elsevier Science Publishing Co.; 1987: 529.
45. **Yang R., Huang B., Zhu Y., Li Y., Liu F., Shi J.** Variable sensitivity to DNA damaging chemotherapeutic modulated by cell type-dependent bimodal p53 dynamics. *Science Advances*. 2018; 4(12):eaat5077. DOI:10.1101/149013.
46. **Purvis J.E., Karhohs K.W., Mock C., Batchelor E., Loewer A., Lahav G.** p53 dynamics control cell fate. *Science*. 2012; 336:1440–1444.
47. **Raimondi L., De Luca A., Morelli E., Giavaresi G., Tagliaferri P., Tassone P., Amodio N.** MicroRNAs: Novel crossroads between myeloma cells and the bone marrow microenvironment. *BioMed Research International*. 2016; 2016:6504593.

48. **Climent M., Viggiani G., Chen Y.-W., Coulis G., Castaldi A.** MicroRNA and ROS crosstalk in cardiac and pulmonary diseases. *International Journal Molecular Sciences*. 2020; 21:4370.
49. **Tian X.-F., Ji F.-J., Zang H.-L., Cao H.** Activation of the miR-34a/SIRT1/p53 signaling pathway contributes to the progress of liver fibrosis via inducing apoptosis in hepatocytes but not in HSCs. *PLoS ONE*. 2016; 11(7):e0158657.
50. **Farghali H., Kemelo M.K., Kutinova C.N.** SIRT1 modulators in experimentally induced liver injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019:8765954.
51. **Solomon J.M., Pasupuleti R., Xu L., McDonagh T., Curtis R., DiStefano P.S., Huber L.J.** Inhibition of SIRT1 Catalytic Activity Increases p53 Acetylation but Does Not Alter Cell Survival following DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*. 2006; 26(1):28–38. DOI:10.1128/MCB.26.1.28-38.2006.
52. **Tramutola A., Pupo G., Domenico F.D., Barone E., Arena A., Lanzillotta C., Brokeart D., Blarzino C., Head E., Butterfield D.A., Perluigi M.** Activation of p53 in down syndrome and in the Ts65Dn mouse brain is associated with a pro-apoptotic phenotype. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016; 52(1):359–371.
53. **Tatarnikova O.G., Orlov M.A., Bobkova N.V.** Beta-amyloid and tau-protein: Structure, interaction, and prion-like properties. *Biochemistry*. 2015; 80(13):1800–1819.
54. **Buckley F.** Modelling Down syndrome. *Down Syndrome Research and Practice*. 2008; 12:98–102.
55. **Biomarkers definitions working group.** Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology Therapeutics*. 2001; 69(3):89–95.
56. **Miroshnichenko I.I., Ptitsina S.N.** Biomarkers in the modern medical and biologic practice. *Biochemistry*. 2009; 55(4):425–440. (In Russ.)
57. **Iorio M.V., Visone R., Leva G., Donati V., Petrocca F., Casalini P., Taccioli C., Volinia S., Liu C.G., Alder H. et al.** MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Research*. 2007; 67:8699–8707.
58. **Shulenina L.V., Mihailov V.F., Ledin E.V., Raeva N.F., Zasukhina G.D.** Evaluation of p53-dependent system of maintaining the genome stability by content of microRNA and mRNA in blood of cancer patients. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2015; 60(1):5–14. (In Russ.)
59. **Titov S.E., Demenkov P.S., Ivanov M.K., Malakhina E.S., Poloz T.L., Tsivlikova E.V., Ganzha M.S., Shevchenko S.P., Gulyaeva L.F., Kolesnikov N.N.** Selection and validation of miRNAs as normalizers for profiling expression of microRNAs isolated from thyroid fine needle aspiration smears. *Oncology Reports*. 2016; 36:2501–2510.
60. **Chang T.-C., Wentzel E., Kent O., Ramachandran K., Mullendore M., Lee K.H., Feldmann G., Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C. et al.** Transactivation of miR34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular Cell*. 2007; 26:745–752.
61. **Bisio A., De Sanctis V., Del Vescovo V., Denti M.A., Jegga A.G., Inga A., Ciribilli Y.** Identification of new p53 target microRNAs by bioinformatics and functional analysis. *BMC Cancer*. 2013; 13:552.
62. **Iglin S.P.** Teoriya veroyatnostey i matematicheskaya statistika na baze MATLAB [Probability theory and mathematical statistics based on MATLAB]. Kharkiv: NTU “KhPP”; 2006: 612. (In Russ.)
63. **Senotrusova S.D.** Vliyaniye deregulyatsii r53-zavisimykh mikroRNK na diagnostiku degenerativnykh zabolevaniy: Rezul'taty matematicheskogo modelirovaniya [Influence of p53-dependent microRNA deregulation on the diagnosis of degenerative diseases: Results of mathematical modelling]. Proceedings of the International Scientific Conference “Actual problems of applied mathematics, computer science and mechanics”. Voronezh: Research publications; 2019: 1069–1073. (In Russ.)