

УДК: 519.6; 51-76

Дерегуляция p53-зависимых микроРНК: результаты математического моделирования

Воропаева О.Ф.¹, Сенотрусова С.Д.^{1,2}, Шокин Ю.И.¹

¹*Институт вычислительных технологий СО РАН, Новосибирск, Россия*

²*Механико-математический факультет, Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Аннотация. Сформулирована математическая модель динамики сети онкомаркеров p53–Mdm2–miRNA для класса микроРНК с прямой положительной связью с белком p53. Выполнено численное исследование функционирования микроРНК в нормальных условиях и в условиях, когда p53 и его ингибитор Mdm2 проявляют критические для состояния пациента свойства и могут быть определены как диагностические маркеры онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Адекватность принятой математической модели и результатов численного анализа подтверждается согласием с известными данными клинических и лабораторных исследований. Изучены варианты дерегуляции микроРНК.

Ключевые слова: численное моделирование, уравнение с запаздыванием, онкомаркер, белок p53, белок Mdm2, микроРНК, положительная прямая связь, онкопрогноз, трансактивация, miR-34, miR-145.

ВВЕДЕНИЕ

Белок p53 участвует в обеспечении адекватного ответа живого организма на накопление повреждений ДНК, в том числе в запуске программы апоптоза – вида клеточной смерти. Белок Mdm2 является одним из ключевых отрицательных регуляторов p53. Чрезмерное накопление или гиперактивация p53 могут вызывать массовую гибель клеток, а подавление функции p53 повышает риск развития опухолевых процессов. Это позволяет использовать p53 и Mdm2 в качестве биомаркеров онкологических заболеваний [1–3]. Известно также, что p53 регулирует целый класс микроРНК (miRNA или miR), которые характеризуются как важнейшие посредники p53 в подавлении опухолей [4–7]. Например, для семейств микроРНК miR-34 и miR-15/16, miR-145 и miR-107 определено множество целей, выполняющих, как и p53, антипролиферативные (а, значит, и противораковые) функции [8–16]. Одновременно мишени этих же микроРНК могут быть и регуляторами процессов, связанных с болезнью Альцгеймера, Паркинсона и другими дегенеративными заболеваниями (см., например, [13, 15, 17]). Более детально медико-биологические аспекты функционирования сети p53–Mdm2–miRNA обсуждаются в [4–24] и цитируемой там литературе. Отметим, что микроРНК – это класс соединений, которые являются относительно новыми модуляторами экспрессии генов и занимают особое место среди онкомаркеров [20]. МикроРНК стабильны в биологических жидкостях, могут быть измерены относительно просто (в сравнении с методикой определения уровней экспрессии генов) и задолго до возникновения патологического состояния [7, 21]. Исследования микроРНК как маркеров различных форм рака считаются одним из наиболее перспективных направлений биомедицины (см., например, [11, 16, 18–22]).

Математические модели сети p53 разной степени сложности предложены в целом ряде работ, среди которых наиболее заметными представляются [25–46] (в этих и других работах из списка литературы можно найти подробный обзор). При выборе подходящих аппроксимаций биологических связей и оценке адекватности моделей одним из главных критериев считается получение качественного согласия с лабораторными исследованиями, свидетельствующими о возникновении колебаний уровня белков p53 и Mdm2 в ответ на стрессовое воздействие (см., например, [26, 30, 31]). Принимается во внимание и тот факт, что *in vitro* реакция Mdm2 на изменение состояния p53 запаздывает, при этом время запаздывания может составлять от нескольких минут до десятков часов. Поэтому в достаточной мере стандартным инструментом моделирования является введение одного или нескольких (в зависимости от степени сложности соответствующей биологической модели) параметров запаздывания, за которыми, помимо прочего, скрыты неучтенные явным образом важные звенья описываемой белковой сети (см., например, модели в [25, 27, 29, 30, 34] и их модификации). Многообразие существующих математических моделей сети p53 и их возрастающая сложность, как правило, отражают стремление исследователей более детально воспроизвести структуру сети и/или учесть влияние как можно большего числа важных факторов (активность белка и др.). Примером детальной модели может послужить, в частности, система уравнений из работы [37] (она описывает динамику 32 компонент сети и имеет 115 кинетических параметров), в рамках которой сделана интересная попытка моделирования функции p53 как регулятора апоптоза и клеточного цикла. Следует отметить, что одним из самых серьезных препятствий для расширения модели сети p53 по-прежнему является отсутствие соответствующего (т.е. столь же полного) объема количественной экспериментальной информации, позволяющей с достаточной достоверностью оценить адекватность математической модели и полученных результатов. Скрупулезный подбор экспериментальных фактов, определяющих границы применимости каждой разработанной модели, является пока нерешенной проблемой.

Подробный обзор работ, в которых представлены математические модели белковых сетей с учетом микроРНК, выполнен, в частности, в [42]. Важные для настоящей работы примеры моделей можно найти в [42–46]. Семейство miR-34 – весьма популярный объект исследования [42–44], причем в модели [44] учитываются одновременно также miR-29a и miR-192. Одной из интересных работ последних лет, связанных с попыткой моделирования сети p53 с учетом микроРНК (miR-16), по-видимому, следовало бы признать работу Йонак и др. [45]. Однако некоторые используемые в этой модели представления вызывают сомнение из-за нарушений естественных требований размерности и связанного с этим отсутствия достаточно ясного «физического» смысла параметров модели. Следует признать, что данная проблема является весьма распространенной для математических моделей самого широкого круга живых систем и требует постоянного внимания.

Известно, что число p53-зависимых микроРНК весьма велико, их собственные функции и связи, как правило, до конца не изучены [5, 6]. Поэтому, наряду с изучением конкретных микроРНК, представляется также разумным подход с точки зрения системной биологии, в рамках которого микроРНК могут быть сгруппированы по некоторым общим свойствам и соответствующим образом учтены в математической модели. Так, в [43] рассматриваются динамические особенности регуляции микроРНК с учетом транскрипционного фактора, мРНК и белка, сформулированы математические модели общего вида, а в качестве примера рассмотрен сигнальный модуль, состоящий из белков p53, Sirt1 и miR-34a. Наконец, отметим работу [46], в которой для сетей типа мРНК–белок–микроРНК предложены самые общие математические модели взаимодействия.

В настоящей работе также принят достаточно общий подход, в рамках которого основное внимание направлено на изучение диагностического потенциала микроРНК конкретного типа – с прямой положительной связью микроРНК с p53, когда обратное воздействие микроРНК на p53 и Mdm2 с достаточной степенью достоверности может быть оценено как малосущественное. Разработана математическая модель и выполнен комплекс численных экспериментов, демонстрирующих ее адекватность как инструмента анализа свойств p53-зависимых микроРНК (указанного класса), обеспечивающих передачу сигнала от белка p53 к его мишени (в [2, 14] используется термин «p53-респонсивные» микроРНК). В рамках принятой модели даны обоснованные на результатах численного анализа оценки свойств микроРНК как факторов диагностики.

1. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Математическая модель

При численном исследовании динамики p53-зависимых микроРНК в качестве базовой математической модели принимается хорошо изученная модель сети p53–Mdm2 [27, 48–53]. Тогда математическая модель сети p53–Mdm2–miRNA, учитывающая прямую положительную связь микроРНК с p53, представляет собой нелинейную систему уравнений с запаздывающими аргументами:

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

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1)) - b_2 y_2(t), \quad (2)$$

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

где взаимодействие белков определяется функциями

$$f(y_1, y_2) = \frac{1}{2} \left(y_1 + y_2 + k_f - \sqrt{(y_1 + y_2 + k_f)^2 - 4y_1 y_2} \right), \quad (4)$$

$$g(y_1, y_2) = \frac{y_1 - f(y_1, y_2)}{y_1 + k_g - f(y_1, y_2)}. \quad (5)$$

Здесь y_1 , y_2 , y_3 – уровни p53, Mdm2 и микроРНК, соответственно; a_1 и c_1 – скорости самопроизвольной генерации белка p53 и микроРНК; a_2 – удельная скорость деградации p53 посредством убиквитинирования; a_3 , b_2 , c_3 – удельные скорости распада p53, Mdm2 и микроРНК; b_1 и c_2 – скорость генерации Mdm2 и удельная скорость генерации микроРНК, обусловленные взаимодействием с p53; k_f – константа диссоциации комплекса p53–Mdm2; k_g – константа диссоциации белка p53 и гена Mdm2. Параметры τ_1 и τ_2 определяют время запаздывания реакции Mdm2 и микроРНК на изменение состояния белка p53.

Начальные данные для системы (1)–(5) задаются в виде функций «истории»:

$$y_k(\theta) = \varphi_k(\theta), \quad \varphi_k(\theta) = 0, \quad k = 1, 2, 3, \quad \theta \in [-\tau, 0], \quad \tau = \max(\tau_1, \tau_2). \quad (6)$$

Состояние нормы (базальное состояние, которому соответствуют параметры, отмеченные всюду верхним индексом b) определяется следующим набором значений параметров модели (1)–(5):

$$\begin{aligned} a_1 = a_1^b = 1 \frac{y \cdot e}{c}, \quad b_1 = b_1^b = 1 \frac{y \cdot e}{c}, \quad c_1 = c_1^b = 1 \frac{y \cdot e}{c}, \\ a_2 = a_2^b = 3 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}, \quad b_2 = b_2^b = 10^{-2} \text{ с}^{-1}, \quad c_2 = c_2^b = 1 \text{ с}^{-1}, \\ a_3 = a_3^b = 10^{-4} \text{ с}^{-1}, \quad c_3 = c_3^b = 1 \text{ с}^{-1}, \quad k_f = k_f^b = 180 \text{ у.е.}, \quad k_g = k_g^b = 28 \text{ у.е.} \end{aligned} \quad (7)$$

Следует отметить, что базальные значения параметров уравнений (1)–(2), (4)–(5) определены в [27], где отмечается согласованность значений (7) с экспериментальными данными. Отметим также, что стационарные и периодические решения этой системы уравнений в широком диапазоне значений параметров модели сети p53–Mdm2 согласуются с экспериментальными данными [3, 48]. Общий вид уравнения динамики микроРНК (3) соответствует принятой биологической модели и является в достаточной мере общепринятым (см., например, [43]). При выборе значений параметров уравнения (3) учитывалось наличие прямой связи микроРНК с p53 и согласование результатов моделирования с известными экспериментальными данными [14] (ниже некоторые важные аспекты этой проблемы будут обсуждаться более детально). В дальнейшем для краткости обозначения размерностей параметров и переменных будут опускаться.

Численный алгоритм и методические расчеты

Алгоритм решения задачи основан на использовании известного метода шагов, который сводится к последовательному решению задачи Коши (1)–(6) на интервалах времени, равных величине запаздывания τ . При этом функции с запаздывающими аргументами являются известными – заданными из начальных условий или из численного решения задачи, полученного на предыдущем этапе реализации метода шагов. Этот классический подход позволяет обоснованно привлекать для решения задачи широкий круг численных методов решения задачи Коши для ОДУ, а также способствует более экономичной организации компьютерных вычислений. На основании результатов численных экспериментов [50, 51] для решения задачи применялся метод предиктор-корректор с итерациями по нелинейности, который обеспечивает второй порядок точности. Из соображений простоты численной реализации шаг по времени h выбирался таким образом, чтобы величины запаздывания τ_1 и τ_2 были кратными h .

Расчеты показали, что при достаточно больших значениях времени характер решения задачи (1)–(6) полностью определяется выбором значений параметров модели, а влияние начальных условий можно считать относительно кратковременным. Так, в случае параметров (7) независимо от вида функций «истории» (6) было получено стационарное решение $y_1^b \approx 154.6347$, $y_2^b \approx 81.3105$, $y_3^b \approx 155.6347$, которое согласуется с описанием состояния нормы [1, 3, 27] и аналитическим стационарным решением системы (1)–(2) с учетом (4)–(5) [27]. Основываясь на этих результатах, в дальнейшем будем полагать начальные данные (6) функциями, тождественно равными нулю. Из численного анализа решений следует, что существуют интервалы изменения параметров k_f и k_g , для которых можно указать интервал значений τ_1 , когда решение теряет устойчивость (бифуркации Андронова-Хопфа). Увеличение τ_1 приводит к появлению релаксационных эффектов (слишком медленных ответов Mdm2 на резкое изменение p53 и наоборот). При проведении расчетов величины запаздывания τ_1 и τ_2 варьировались в диапазоне от 60 с до 10000 с. Основные серии численных экспериментов, если это особо не оговорено, проводились при $\tau_1 = 120$ с. При значениях запаздывания τ , не превышающих нескольких сотен секунд, оптимальной была признана расчетная сетка с разрешением не более 100 точек на 1 секунду, а при увеличении запаздывания шаг сетки может быть скорректирован в сторону роста.

Более подробно вопросы построения оптимального численного алгоритма обсуждаются в [50, 51].

Особенности динамики p53–Mdm2

В модели (1)–(5) уравнение динамики микроРНК (3) играет пассивную роль (в силу принятой модели связи микроРНК с p53), что позволяет воспользоваться полученными ранее данными о характере изменений p53 и Mdm2. Подробные сведения о результатах численного решения задачи (1)–(2), (4)–(5) с начальными условиями (6), включая методические расчеты, исследование вопросов функционирования системы в условиях стресса при ультрадианных колебаниях в сети p53–Mdm2 и ее регуляции (перехода от состояния стресса к состоянию нормы) обсуждались в работах [49–53]. В [48] адекватность модели (1)–(2), (4)–(5) как инструмента исследования отрицательной обратной связи в сети белка p53 подтверждается сопоставлением вычисленных и измеренных в экспериментах [3] характерных значений уровня сигналов p53 и Wip1 (белок Wip1, как и Mdm2, является отрицательным регулятором p53) в норме и в условиях стресса.

Результаты предыдущих исследований [48–53] показали, что принятая математическая модель динамики сети p53–Mdm2 адекватно воспроизводит целый ряд известных экспериментальных фактов. Для данного исследования наиболее значимыми представляются полученные в ходе моделирования характерные ситуации, используемые в клинической практике для оценки p53 и Mdm2 как факторов онкопрогноза. Речь идет, в первую очередь, о возможности резкого снижения p53 и, как следствие, затухания p53-зависимого апоптоза, в результате чего в организме накапливаются клетки с дефектами ДНК, в том числе раковые клетки (далее будем упоминать ее как ситуацию *C* от *cancer*). Модель описывает также ситуацию с избыточным уровнем p53, которая угрожает чрезмерным p53-зависимым апоптозом и дегеративно-клеточными патологиями (далее – ситуация *D* от *degeneration*). Важное значение имеют решения в виде периодических колебаний уровней p53 и Mdm2, описывающих наблюдаемый *in vitro* ответ данной динамической системы на стресс (далее – ситуация *R* от *response*). Ключевую роль играет базирующееся на результатах лабораторных измерений (см., например, [1, 3, 27]) приближенное определение базального состояния системы p53–Mdm2 (далее – ситуация *N* от *normal*).

Отметим, что в рамках принятой модели ситуация *D* возникает в результате дисбаланса в скоростях генерации p53 и деградации Mdm2, а также вследствие нарушений в механизме взаимодействия белков, который регулируется через константы диссоциации; риск ситуации *C* связывается с резким повышением уровня Mdm2 в результате замедления его деградации или, напротив, чрезмерно высокой скорости его генерации; ситуация *R* возможна при усилении или ослаблении взаимосвязи в сети p53–Mdm2, как правило, с ростом запаздывания τ_1 [27, 49].

2. НОРМАЛЬНОЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ микроРНК ПРИ ДЕРЕГУЛЯЦИИ p53

Методические расчеты

Из математической модели (1)–(5) следует, что положительная прямая связь микроРНК с p53 реализуется через введение двух параметров – удельной скорости генерации микроРНК c_2 и времени запаздывания τ_2 . Вопрос об определении значений этих и других параметров уравнения (3) решался на основе анализа лабораторных данных и общих представлений о совместной динамике микроРНК и p53. Так, из сопоставления результатов анализа функциональных проб дрожжевых культур, представленных в [14], можно сделать предположение, что молекулы miR-34a –

представители одного из наиболее изученных семейств микроРНК, для которых с некоторой степенью достоверности может быть принят вариант прямой положительной связи – активируются в норме в той же степени, что и p53. В рамках принятой математической модели это соответствует совместной динамике p53 и микроРНК при $c_1 = c_1^b = 1$, $c_2 = c_2^b = 1$, $c_3 = c_3^b = 1$.

На рисунке 1 показаны в сопоставлении относительные изменения уровней p53 и микроРНК при активации p53. Данные представляются в виде фолд-изменения: $fold = (y_{fin} - y_0) / y_0$, где y_0 и y_{fin} – начальное и конечное значения величины. Можно видеть достаточно хорошее соответствие лабораторных [14] и рассчитанных относительных изменений p53 и микроРНК при $c_i = c_i^b$, $i = 1, 2, 3$ (при сильной активации p53 *in vitro*), что свидетельствует, в частности, о достижении в рамках принятой модели необходимого баланса между p53 и микроРНК в норме. Ниже будут рассмотрены и другие варианты p53-зависимой активации микроРНК (более или менее сильной), для которых, по-видимому, также могут быть названы конкретные микроРНК с рассматриваемым типом связи с p53. Однако в рамках настоящей работы будем принимать в качестве базальных именно значения (7). Таким образом, экспериментальные данные [14] позволяют сделать вывод об адекватности принятого в настоящей работе описания нормального функционирования микроРНК и параметров уравнения (3).

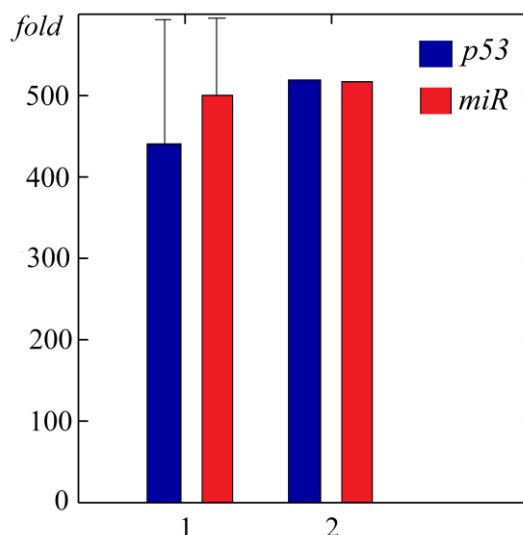


Рис. 1. p53-зависимая активация микроРНК. Относительные изменения уровней p53 и микроРНК при активации p53: 1 – *in vitro* [14], 2 – в расчетах при $a_1 = 11a_1^b$.

Изучалось также влияние параметра запаздывания τ_2 на поведение компоненты решения y_3 . Получено, что в достаточно широком диапазоне значений параметров модели (1)–(5) y_3 имеет тот же тип зависимости от времени, что и y_1 : со временем выходит на стационарное значение, либо теряет устойчивость, переходя в режим периодических колебаний. С ростом τ_2 характер зависимости микроРНК от p53 и времени не меняется, изменения сводятся только к фазовому сдвигу функции y_3 по временной оси на величину, равную запаздыванию τ_2 . Таким образом, период колебаний y_3 определяется не τ_2 , а временем τ_1 запаздывания реакции Mdm2 на изменение состояния p53. В рамках принятой модели данный тип зависимости

наблюдается при варьировании параметров запаздывания в достаточно широком диапазоне значений.

Связь микроРНК с p53 в условиях стресса

В настоящем разделе основное внимание уделяется изучению особенностей нормального функционирования микроРНК в важных для клинической практики ситуациях C , D , R и N , характеризующих состояния системы p53–Mdm2.

На рисунке 2 представлена совместная динамика p53 и микроРНК в виде зависимости от времени и фазовых портретов решений в ситуациях N , C , D и R (соответствующие решения получены при значениях параметров (7) или изменения одного из значений в этом наборе параметров). Видно, что поведение микроРНК аналогично p53: уровень микроРНК снижается относительно базального состояния вслед за p53 в ситуации C и, наоборот, резко возрастает в ситуации D чрезмерного роста p53. Запуск периодических колебаний микроРНК происходит вслед за их возникновением в сети p53–Mdm2 при ослаблении (ситуация R^*) и, наоборот, усилении (ситуация R) связи белка p53 и белка Mdm2 или одноименного гена. Здесь R^* представляет вариант динамического поведения, когда при достаточно большом времени запаздывания $\tau_1 = 4000$ с микроРНК, как и p53, могут достигать базального уровня, однако амплитуды периодических колебаний столь существенны, что большую часть времени уровни микроРНК и p53 соответствуют ситуации D .

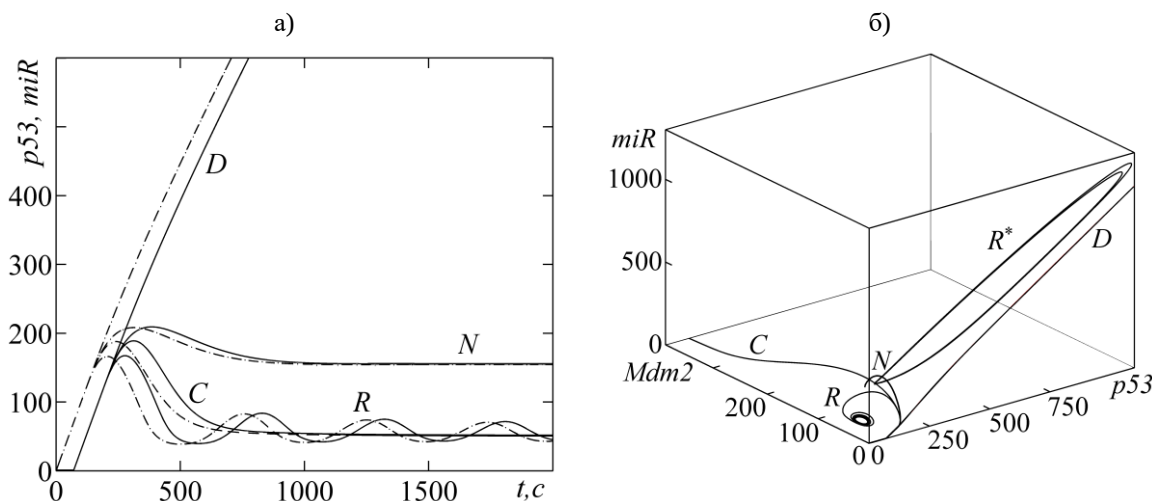


Рис. 2. Совместная динамика p53 и микроРНК в характерных медико-биологических ситуациях: **а)** $u_3(t)$ – сплошные кривые, $u_1(t)$ – штрих-пунктирные кривые, **б)** фазовые портреты системы p53–Mdm2–miRNA. Линии N соответствуют базальному состоянию (7), линии D получены при $b_1 = 0.1b_1^b$, линии C – при $b_2 = 0.1b_2^b$, линии R – при $k_f = 0.022k_f^b$ ($\tau_1 = 120$ с); линия R^* – при $k_g = 14.285k_g^b$ ($\tau_1 = 4000$ с).

Одним из ключевых является вопрос о соответствии полученных результатов известным из лабораторных экспериментов представлениям о поведении p53-зависимых микроРНК с прямой положительной связью. При этом, очевидно, речь должна идти о конкретных микроРНК, для которых по результатам биологических исследований прямая положительная связь с p53 может быть принята с некоторой степенью достоверности. Среди кандидатов для такого сопоставления, как и прежде – микроРНК miR-34. Хотя в последнее десятилетие оценки степени обратного влияния miR-34 (miR-34a/b/c) на p53 претерпевали изменения – от полного отрицания до установления связи через посредство сети белков, являющихся мишенью miR-34 [5], все же в значительной части лабораторных экспериментов анализируется только участок сети p53–miR-34, на котором, по-видимому, определяющую роль играет

именно прямое положительное воздействие p53 на микроРНК. Молекулы miR-34 являются мишенью p53, участвующей в запуске программы апоптотической гибели клеток и регуляции целого ряда собственных мишеней с широким спектром функций. Результаты лабораторных исследований указывают на отсутствие (с достаточной степенью точности) собственных проапоптотических свойств miR-34: микроРНК могут быть геном-супрессором опухолей (особенно, miR-34a), но они должны работать совместно с p53 [16]. Достаточно хорошо известно также семейство микроРНК miR-145 как важный посредник p53 в негативной регуляции ряда онкогенов, в том числе, например, протоонкогена c-Myc [12].

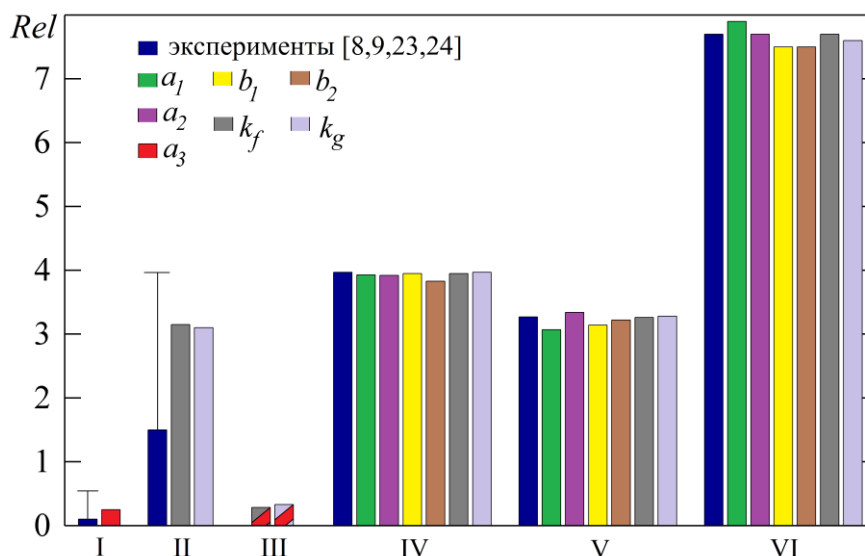


Рис. 3. Изменение уровней микроРНК miR-34a (I–III), miR-34c (IV), miR-34b (V) и miR-145 (VI) в характерных ситуациях С (I, III) и D (IV–VI). Лабораторные и клинические измерения представлены данными из литературы для серий I [8], II [9], IV и V [23], VI [24]; расчетные данные получены при варьировании соответствующего параметра в (7).

Результаты расчетов, иллюстрирующих изменение уровня микроРНК в характерных ситуациях С и D, приведены на рисунке 3 в сопоставлении с экспериментальными данными. Здесь экспериментальные данные [8, 9, 23, 24] представлены в виде изменения уровней микроРНК по отношению к значению, измеренному в здоровой ткани, а в численных экспериментах полагалось $Rel = y_{3fin}/y_3^b$. Измерения уровней miR-34 и miR-145 проводились в клинических условиях у больных разными формами рака и болезнью Альцгеймера, в искусственно культивируемых *in vitro* клеточных культурах или *in vivo* в клетках подопытных животных. Так, в ситуации С снижение экспрессии микроРНК miR-34a часто наблюдается в клетках рака поджелудочной железы, которые одновременно демонстрируют и потерю функции p53. В частности, опубликованные в [8] исследования 15 панкреатических линий раковых клеток показывают, по крайней мере, двухкратное снижение экспрессии miR-34a по сравнению с нормальными клетками этого органа. В одиннадцати из представленных клеточных линий имело место снижение miR-34a в 10 раз и более или даже полное отсутствие этих микроРНК. В рамках модели (1)–(5) подобное поведение сети p53–miRNA получено при увеличении скорости распада p53 в 200 раз ($a_3 = 0.02$; результат сопоставления можно видеть в серии I на рисунке 3). В экспериментах [9] с клетками рака легких (клетки линии H1299) получены аналогичные данные, здесь же *in vivo* лабораторные мыши – здоровые и с дефицитом p53 – подвергались облучению, которое следует рассматривать как способ вызвать реакцию динамической системы на стресс. В

результате было установлено, что только у здоровых животных в ответ на облучение уровень miR-34a повышался в 1.5–4 раза, а аналогичное воздействие на мутантных мышей не вызывает статистически значимой реакции. Интересно, что в расчетах такая реакция на облучение здоровых мышей может быть адекватно описана только при увеличении констант диссоциации при $k_f = 5k_f^b$ или $k_g = 20k_g^b$ (серия II на рис. 3), а после облучения мышей с дефицитом p53 – при $a_3 = 200a_3^b$, $k_f = 5k_f^b$ или $a_3 = 200a_3^b$, $k_g = 20k_g^b$ (серия расчетов III на рис. 3). Помимо прочего, это согласуется с результатами лабораторных исследований [3], свидетельствующими о нарушении взаимосвязи p53 и Mdm2 в условиях стресса. Ситуацию D повышенного уровня p53-зависимых микроРНК при болезни Альцгеймера по отношению к наблюдаемому в здоровой ткани иллюстрируют клинические данные о микроРНК miR-34c, miR-34b [23] и miR-145 [24], представленные в сериях IV–VI на рисунке 3. В рамках принятой математической модели эти ситуации могут быть получены в одном из следующих вариантов варьирования параметров: в серии IV – при $a_1 = 2.2a_1^b$, $a_2 = 0.44a_2^b$, $b_1 = 0.43b_1^b$, $b_2 = 2.3b_2^b$, $k_f = 6.6k_f^b$ или $k_g = 30k_g^b$; в серии V – при $a_1 = 2a_1^b$, $a_2 = 0.47a_2^b$, $b_1 = 0.47b_1^b$, $b_2 = 2.15b_2^b$, $k_f = 5.2k_f^b$ или $k_g = 22k_g^b$; в серии VI – при $a_1 = 2.65a_1^b$, $a_2 = 0.35a_2^b$, $b_1 = 0.35b_1^b$, $b_2 = 2.86b_2^b$, $k_f = 15k_f^b$ или $k_g = 80k_g^b$. Представленные результаты подтверждают адекватность принятого в настоящей работе подхода к моделированию функционирования микроРНК и описанию важных для клинической практики ситуаций с признаками дерегуляции p53-зависимого апоптоза, включая разные формы рака и болезнь Альцгеймера.

3. ТРАНСАКТИВАЦИЯ микроРНК КАК РЕАЛИЗАЦИЯ ПРЯМОЙ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ СВЯЗИ С p53

В центре внимания целого ряда лабораторных исследований – оценка способности микроРНК активироваться в ответ на активацию p53. В настоящей работе эти данные, в первую очередь, используются для анализа адекватности принятой математической модели. Для сопоставлений привлекаются результаты экспериментальных измерений зрелых микроРНК в искусственно культивируемых *in vitro* клеточных культурах. В [14] исследуются, в частности, функциональные пробы дрожжевых культур с целью анализа способности белка p53 дикого типа трансаktivировать микроРНК. Показано, что разные микроРНК могут активироваться с разной степенью интенсивности, так что p53-обусловленная фолд-индукция *fold* составляет 0.5–1 для miR-145, 115–130 для miR-10b и 500–580 для miR-34a. Здесь же *in vitro* анализировалась способность p53 трансаktivировать p53-респонсивные микроРНК в условиях, моделирующих синдром Ли-Фраумени (генетически обусловленную потерю функции p53-зависимого апоптоза, вызывающую поразительное множество разных форм рака у членов одной семьи). Продемонстрированная в лабораторном эксперименте [14] реакция miR-34a на активацию миссенс-мутантов p53 с частичной потерей функции также свидетельствует о наличии положительной прямой связи с p53: снижение функции p53 приводит к относительному снижению активности микроРНК. В экспериментах [10] уровни микроРНК miR-34a через несколько часов после активации p53 *in vitro* в иммортализованных клетках H1299, обладающих способностью бесконечного деления вследствие затухания функции p53-зависимого апоптоза, могут возрастать в 325–475 раз. В [12] через 24 часа после активации p53 *in vitro* в человеческих опухолевых клетках MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека), в которых экспрессируется p53 дикого типа, относительный уровень miR-145 возрастает в 12 раз.

Полученные в расчетах с применением модели (1)–(5) диапазоны изменения микроРНК соответствуют наблюдаемым *in vitro* для достаточно большого набора клеточных культур и конкретных р53-респонсивных микроРНК с заданным типом связи. Ниже представлены результаты двух вариантов численных экспериментов, каждый из которых состоит из пяти серий расчетов, где серии I–IV связываются с лабораторными измерениями miR-34a [14], серия V – с измерениями miR-145c [12]. Схема проведения численных экспериментов состоит из двух этапов. Сначала в рамках модели воспроизводятся исходные свойства р53 до активации: для р53 дикого типа – базальное состояние системы р53–Mdm2, для мутантных – соответствующее эксперименту снижение уровня р53. Второй этап моделирует воздействие активирующего р53 вещества для наблюдения за последующей трансаактивацией микроРНК. Считаем для простоты, что активирующее вещество вызывает отклик (в рамках принятой модели) в виде ускорения или, наоборот, затухания процесса самопроизвольной генерации р53. Это означает, что в расчетах ситуация активации р53 моделируется варьированием параметра a_1 по отношению к базальному состоянию – для сопоставления с данными [12, 14] для р53 дикого типа (в сериях V и I соответственно) или по отношению к состоянию со сниженным уровнем р53 – для сопоставления с данными [14] для мутантных р53 (в сериях II–IV). Предполагалось также, что регуляция микроРНК всегда соответствует норме, определяемой параметрами $c_i = c_i^b$ (7). Расчетные данные об изменении уровня микроРНК под воздействием стрессовых факторов, направленных на активацию р53, как и в соответствующих лабораторных исследованиях [12, 14], представляются в виде фолд-изменения $fold = (y_{fin} - y_0)/y_0$, где y_{fin} – конечное значение уровня микроРНК на втором этапе эксперимента, y_0 – значение до активации, т. е. перед началом второго этапа моделирования. Очевидно, что положительные значения $fold$ соответствуют повышению, а отрицательные – снижению уровня микроРНК относительно уровня до активации.

В первой части численных экспериментов предполагалось, что причина первоначального (до активации) угасания функции р53 в рамках принятой математической модели слабо влияет на способность активирующего вещества воздействовать на р53. Результаты расчетов в сопоставлении с данными лабораторных экспериментов представлены на рисунке 4. В серии I активация микроРНК, соответствующая данным [14], получена только при достаточно высокой скорости генерации р53 $a_1 \approx 11a_1^b$. В серии II *in vitro* активировался миссенс-мутант р53 (A138S) со снижением функции примерно на 33.3 %; в математической модели близкое к данному начальное состояние может быть получено в одном из вариантов: при $a_1 = 0.7a_1^b$, $a_2 = 1.5a_2^b$, $a_3 = 35a_3^b$, $b_1 = 1.7b_1^b$ или $b_2 = 0.6b_2^b$. Конечное состояние, соответствующее экспериментальному уровню трансаактивации микроРНК, получен в модели при $a_1 = 5.8a_1^b$. В серии III *in vitro* активировался миссенс-мутант р53 (R337C) со снижением р53 до уровня 10 % от базального значения, а в модели такое начальное состояние может достигаться в одном из следующих случаев – при $a_1 = 0.065a_1^b$, $a_2 = 16a_2^b$, $a_3 = 600a_3^b$. Основной этап – активация микроРНК посредством р53 – осуществляется в модели через параметр $a_1 = 2.24a_1^b$, что позволяет достичь согласия с данными [14]. В серии IV сопоставляются данные о трансаактивационной способности *in vitro* мутанта C141Y со снижением функции р53 до 5 % от базального. Эти начальные условия в математической модели могут быть получены при $a_1 = 0.02a_1^b$, $a_2 = 50a_2^b$ или $a_3 = 1400a_3^b$, а конечное состояние, близкое к эксперименту [14] – при

$a_1 = 0.42a_1^b$. В серии V трансактивация микроРНК в ответ на активацию p53 дикого типа, близкая к описанной в [12], соответствует решению задачи (1)–(6) при любом из параметров $a_1 = 2.92a_1^b$, $a_2 = 0.3a_2^b$, $b_1 = 0.292b_1^b$ или $b_2 = 3.4b_2^b$ (как и прежде, остальные параметры модели остаются равными значениям (7)). Отметим, что на рисунке 4 окрашенные столбцы с результатами математического моделирования соответствуют варьированию разных параметров модели. Здесь и ниже на диаграммах отсутствие столбца определенного цвета в сериях I–V означает, что изменение соответствующего параметра не может привести к достижению необходимого уровня микроРНК (в расчетах не рассматривались отклонения параметров на шесть и более порядков относительно базальных значений как весьма отдаленные от практических ситуаций).

Во второй части численных экспериментов предполагалось, что активирующее вещество способно преодолеть угасание функции p53, однако первопричина этого дефекта сохраняется и после принудительной активации. Как и прежде, каждый численный эксперимент проводится в два этапа, при этом, в отличие от представленного ранее, на втором этапе учитываются изменения значений параметров модели, осуществленные на первом этапе. При данном подходе, очевидно, изменяются только результаты серий II–IV, они на рисунке 4 помечены звездочкой*. В серии II* соответствующее эксперименту снижение функции p53 на 33.3 %, как и первом варианте расчетов, было получено при $a_2 = 1.5a_2^b$, $a_3 = 35a_3^b$, $b_1 = 1.7b_1^b$ или $b_2 = 0.6b_2^b$, а конечное состояние микроРНК, близкое к [14] – при дополнительном изменении параметра $a_1 = qa_1^b$, где $q = 7.3, 100, 7.8, 7.8$ в каждом из вариантов первого этапа соответственно. В серии III* начальное состояние вновь достигается при $a_2 = 16a_2^b$ или $a_3 = 600a_3^b$. Основной этап – активация микроРНК посредством p53 – осуществляется через последующее изменение параметра a_1 , который полагался в этих двух случаях равным $35a_1^b$ или $41a_1^b$ соответственно, что позволило достичь согласия с данными [14]. В серии IV* снижение функции p53 до уровня 5 % от базального получено при $a_2 = 50a_2^b$ или $a_3 = 1400a_3^b$, а на втором этапе для достижения конечного состояния, близкого к эксперименту [14], дополнительно полагалось $a_1 = 21a_1^b$ или $a_1 = 11a_1^b$ соответственно.

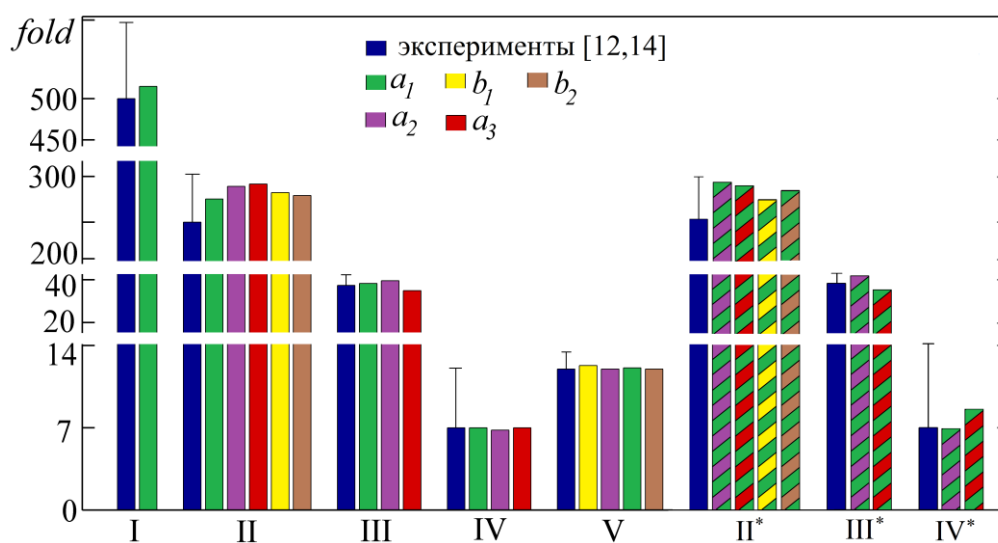


Рис. 4. Оценка способности микроРНК активироваться в ответ на активацию p53. Относительное изменение уровня miR-34a (столбцы I–IV) и miR-145 (столбец V) при активации p53 дикого типа (I, V) и мутантных p53 со сниженной функцией апоптоза (II–IV). Данные, помеченные *, получены в соответствующих расчетах с учетом причин первоначального снижения функции p53.

Приведенные в настоящем разделе результаты расчетов, безусловно, не претендуют на детальное воспроизведение экспериментов *in vitro*. Причины сложностей, возникающих при сопоставлении экспериментальных и расчетных данных, кроются в отсутствии (свойственном для большинства сложных динамических систем в биологии и медицине) необходимых для тщательного моделирования данных об условиях проведения лабораторных измерений, которые могли бы быть адекватно учтены в рамках принятой математической модели. Однако результаты сопоставлений дают представление о широте диапазонов изменения уровней p53, микроРНК и значений параметров, в которых принятую математическую модель функционирования сети p53–Mdm2–miRNA можно рассматривать как инструмент для приближенной оценки свойств p53-зависимых микроРНК с прямой положительной связью.

4. НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ микроРНК

Поводом для дальнейших численных экспериментов стали полученные в лабораторных и клинических исследованиях свидетельства о возможной дерегуляции микроРНК, а также значительной роли этих процессов в развитии злокачественных новообразований (см., например, [18, 22]). В данной серии расчетов стрессовые условия моделировались как отклонение параметров c_1 , c_2 , c_3 от базальных значений c_1^b , c_2^b , c_3^b (7). В качестве допустимого изменения уровня микроРНК, при котором состояние микроРНК считается нормальным, будем принимать 50-процентное отклонение от базального уровня (в сторону убывания или роста). Эта оценка границы нормы является достаточно усредненной. Она основана на анализе данных клинических и лабораторных измерений (см., например [12, 14, 22]), в которых уровень микроРНК в клетках разных форм рака может составлять от 20 до 80 % от уровня в нормальной ткани (в то же время, для многих других микроРНК изменение уровней в раковых клетках может быть существенно более значительным). Точно также, 50-процентное отклонение уровня микроРНК от характерного значения, полученного в ситуациях C , D и R , будем считать допустимым для сохранения p53-обусловленных диагностических свойств микроРНК в этих ситуациях. Варианты решений, когда чрезмерно завышенный или, наоборот, резко сниженный уровень микроРНК не согласуется с поведением p53, будем далее упоминать как ситуации S^{inc} и S^{dec} соответственно. Отличие этих ситуаций от D и C заключается в том, что функции и мишени конкретных микроРНК этого класса могут быть как про-, так и противоапоптотическими. Это не позволяет в рамках настоящего исследования однозначно определить, как в случае с p53, биомедицинские последствия ситуаций S^{inc} и S^{dec} . Ситуация нормы, определяемая только уровнем микроРНК вне связи с p53, будет обозначаться далее N^{miR} . Таким образом, ситуации S^{inc} , S^{dec} и N^{miR} следует воспринимать как свидетельство дисбаланса в сети p53–miRNA.

Базальное состояние системы p53–Mdm2 (ситуация N)

Рассмотрим более детально динамику микроРНК в условиях нормального функционирования сети p53–Mdm2 и одновременного нарушения функционирования микроРНК, когда скорости собственной и p53-обусловленной генерации и скорость деградации микроРНК отклоняются от принятого сценария нормы.

Некоторые решения задачи, наблюдаемые в окрестности базального состояния системы p53–miRNA при поочередном изменении параметров c_1 , c_2 и c_3 , показаны на рисунках 5,а–в соответственно. Горизонтальные штриховые линии разделяют плоскость решений на области с нормальным (затененная зона), пониженным (область S^{dec}) и повышенным (область S^{inc}) уровнем микроРНК. Вертикальные штриховые линии отделяют область решений с нормальным уровнем p53 от области критических

значений (разделение основано на выводах экспериментальной работы [3]). Относительная простота фазовых портретов согласуется с известными представлениями о функционировании p53 в нормальных условиях [1, 3]. Ниже результаты этой серии численных экспериментов будут представлены более детально.

При варьировании значения скорости самопроизвольной генерации удобно полагать $c_1 = qc_1^b$. В расчетах коэффициент q изменялся в диапазоне от 10^{-3} до 10^3 . Все полученные решения имеют неподвижные предельные точки в фазовом пространстве (y_1, y_2, y_3) . Расчеты показывают, что при любых $q \leq 10$ состояние микроРНК практически не отличается от базального (при $q = 0.1$ отличие составляет 0.6 %, а при $q = 10$ – 5.8 %). При $q \approx 100$ уровень микроРНК примерно в два раза превышает базальный. При дальнейшем возрастании c_1 наблюдается рост характерных значений микроРНК, однако даже при 200-кратном увеличении этого параметра уровень микроРНК возрастает менее чем в три раза. Представляется, что указанная закономерность может быть обусловлена особенностями принятой математической модели, поэтому вопрос об уточнении роли скорости самопроизвольной генерации будет изучаться в будущем более тщательно с применением усовершенствованных моделей сети p53–miRNA.

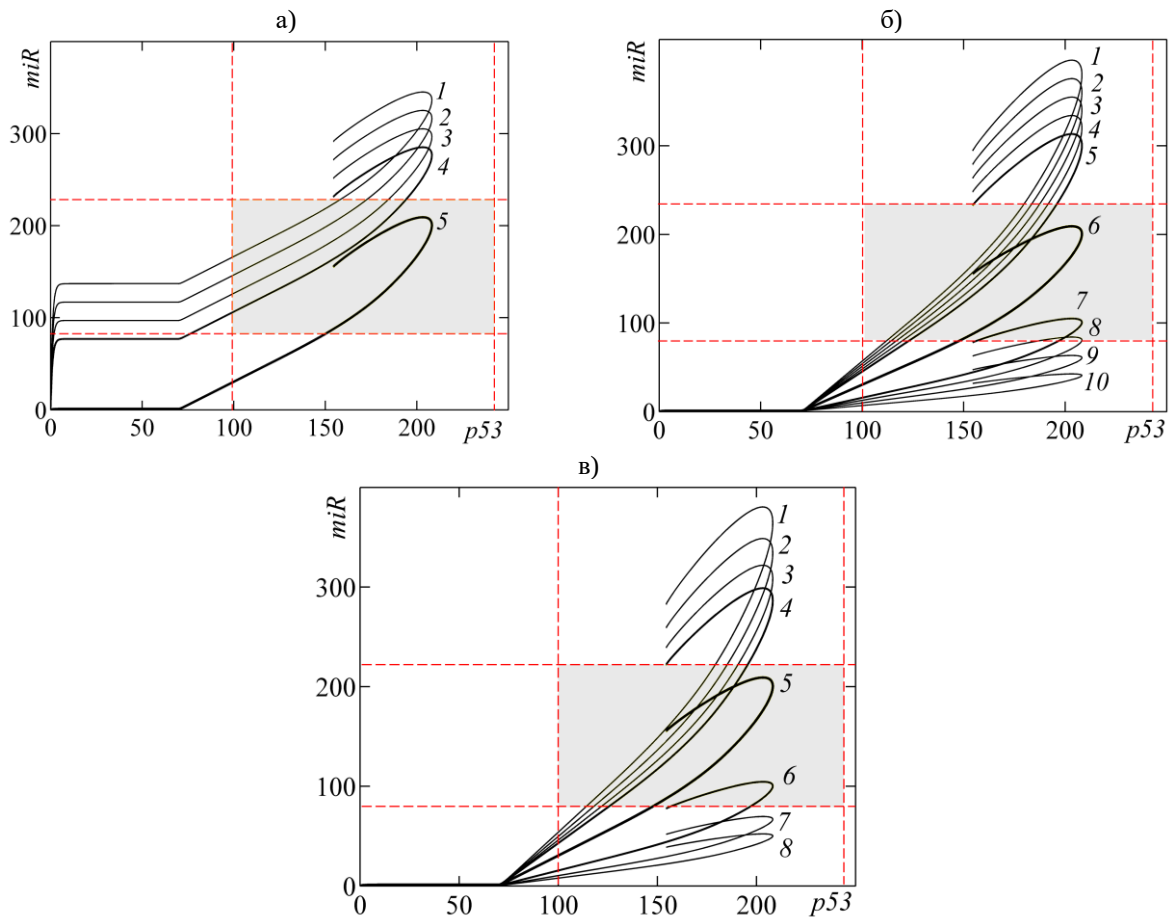


Рис. 5. Дерегуляция микроРНК в ситуации N . Фазовые портреты системы p53–miRNA при базальном состоянии p53: а) линии 1–5 соответствуют $c_1 = 137, 117, 97, 77, 1$; б) линии 1–10 соответствуют $c_2 = 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2$; в) линии 1–8 соответствуют $c_3 = 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 1, 2, 3, 4$.

Значения скорости генерации микроРНК за счет p53 $c_2 = qc_2^b$ варьировались в диапазоне $q \in [10^{-2}, 10^3]$. Расчеты демонстрируют достаточно высокую

чувствительность модели к изменению данного параметра. Можно отметить, что близкое к базальному поведение микроРНК сохраняется лишь при отклонении c_2 от базального значения не более чем на 30–50 % (как в сторону роста, так и в сторону убывания). При более существенном повышении c_2 наблюдается рост характерных значений микроРНК, так что уже при 10-кратном увеличении этого параметра уровень микроРНК возрастает более чем на порядок, а при $q = 0.5$ происходит кратное уменьшение микроРНК.

Значения скорости деградации микроРНК $c_3 = qc_3^b$ варьировались в диапазоне $q \in [10^{-4}; 200]$, при этом остальные параметры системы (1)–(6) принимались базальными (7). Чувствительность модели микроРНК к изменению данного параметра особенно высока. Близкое к базальному (обусловленному соответствующей динамикой р53) поведение микроРНК имеет место лишь при отклонении от базального значения c_3 не более чем на 10–30 %. При превышении указанного диапазона q наблюдается падение характерных значений микроРНК, так что уже при 10-кратном увеличении c_3 уровень микроРНК снижается до критических отметок. Уменьшение c_3 на 50 % и более влечет за собой рост уровня микроРНК более чем в два раза.

Более наглядно эти результаты представлены на рисунке 6 в виде данных об изменении характерных значений микроРНК по отношению к уровню в описываемой ситуации N , т.е. к базальному. Окрашенная область очерчивает границы допустимых изменений микроРНК, при которых их уровень принято считать нормальным, здесь же показаны допустимые (для сохранения этого состояния) изменения параметров. Видно, что только уменьшение параметра c_1 не может вывести уровень микроРНК за пределы допустимых значений. Последнее подтверждают показанные на рисунке 7 зависимости стационарных значений микроРНК от параметров c_1 , c_2 , c_3 . В рамках принятой модели изменение уровня микроРНК обратно пропорционально c_3 и прямо пропорционально изменениям c_1 и c_2 . Как и ранее, цветом выделены области допустимых значений параметров c_i ($i = 1, 2, 3$) и микроРНК, при которых уровень микроРНК, вслед за р53, остается близким к норме. Значения параметров c_i вне окрашенных зон соответствуют более высоким (S^{inc}) или более низким уровням микроРНК (S^{dec}).

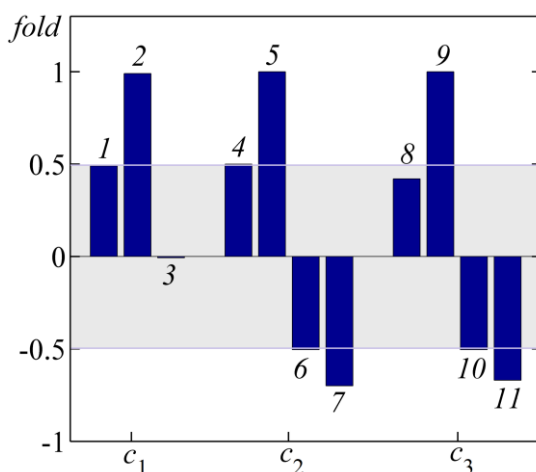


Рис. 6. Дерегуляция микроРНК в ситуации N . Изменение уровня микроРНК по отношению к базальному значению: $c_1 = 77$ (1), 155 (2), 10^{-4} (3); $c_2 = 1.5$ (4), 2 (5), 0.5 (6), 0.3 (7); $c_3 = 0.7$ (8), 0.5 (9), 2 (10), 3 (11).

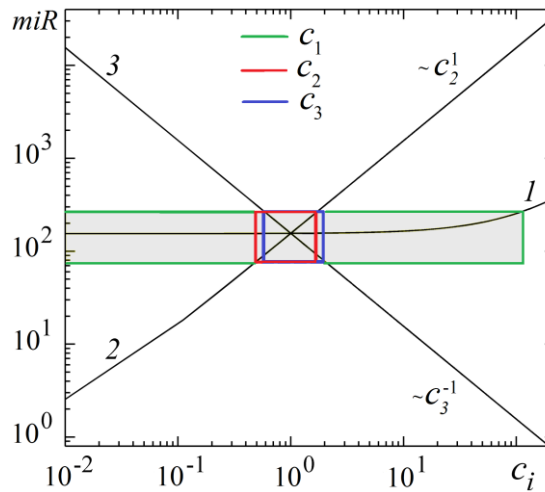


Рис. 7. Зависимость стационарных значений микроРНК от параметров: 1 – $y_3(c_1)$, 2 – $y_3(c_2)$, 3 – $y_3(c_3)$; выделенные цветом затененные области иллюстрируют интервалы значений параметров c_1 , c_2 , c_3 , в которых уровень микроРНК близок к норме.

Представленные в настоящем разделе результаты численных экспериментов указывают на наличие рассогласованности в поведении p53 и p53-респонсивных микроРНК при дерегуляции последних. Это существенно затрудняет использование микроРНК в диагностических целях и, следовательно, требует более детального изучения собственных функций и мишеней микроРНК рассматриваемого класса.

Чрезмерно низкий уровень p53 (ситуация С)

Ситуация низкого уровня p53 на фоне завышенного уровня Mdm2 вызывает особый интерес в связи с тем, что она соответствует клинически наблюдаемым условиям риска онкологических заболеваний, которые могут быть обнаружены из лабораторного анализа p53 или Mdm2. В рамках принятой модели подобная ситуация наиболее ярко проявляется при гиперфункции Mdm2, поэтому далее при изучении свойств микроРНК, не нарушая общности, полагаем $b_2 = 0.1b_2^b$. Тогда при нормальном функционировании связи микроРНК с p53 (т.е. при $c_1 = c_1^b$, $c_2 = c_2^b$, $c_3 = c_3^b$) уровень микроРНК также оказывается достаточно низким, соответствующим дефициту p53 (см. рис. 2).

Как и прежде, значения скорости самопроизвольной генерации полагались равными $c_1 = qc_1^b$, где коэффициент q изменялся в достаточно широком диапазоне значений. В расчетах при $q < 25$ уровень микроРНК остается низким, соответствующим с 50-процентной точностью ситуации С. Дальнейшее увеличение q приближает уровень микроРНК к базальному (это ситуация нормы N^{miR} , поскольку уровень p53 в ситуации С снижен). А уже при $c_1 \geq 250$ стационарные значения микроРНК соответствуют ситуации S^{inc} .

Еще более ярко отмеченные свойства микроРНК проявляются при варьировании параметра $c_2 = qc_2^b$. Расчеты показали, что только в весьма узком диапазоне значений $0.5 \leq q \leq 1.5$ уровень микроРНК соответствует уровню p53. При уменьшении c_2 более чем в два раза микроРНК могут быть даже лучшим фактором прогноза, чем p53, поскольку уровень микроРНК становится критически низким. Напротив, уже трехкратное увеличение параметра c_2 обеспечивает динамику микроРНК, которая, в противоположность p53, с весьма высокой точностью указывает на состояние N^{miR} (кроме кратного τ_1 интервала времени, продолжительность которого зависит в

численном эксперименте от начальных условий). При дальнейшем повышении c_2 уровень микроРНК скорее указывает на характерную ситуацию S^{inc} . Таким образом, при более чем двукратном повышении скорости р53-обусловленной генерации микроРНК могут демонстрировать поведение, отличное от р53, и, таким образом, иметь собственные, отличные от р53, диагностические и прогностические свойства.

В случае варьирования скорости распада $c_3 = qc_3^b$ при $0.7 \leq q \leq 2$ микроРНК указывают на то же состояние, что и р53 (с точностью до 50 % относительно уровня, принятого в качестве характерного для рассматриваемой ситуации S). Вне этого интервала значений q состояние микроРНК таково, что либо (при больших q) критически низкий уровень микроРНК более ясно, чем р53, сигнализирует об онкоопасности, либо при $q \leq 0.3$ микроРНК демонстрирует противоположные р53 свойства, т. е. указывает на ситуации N^{miR} или S^{inc} .

Для иллюстрации этих данных на рисунке 8 показаны изменения стационарных значений микроРНК по отношению к их уровню в описываемой ситуации S . Окрашенная область очерчивает границы допустимых изменений микроРНК, при которых уровень микроРНК согласуется с р53. Здесь же показаны допустимые для сохранения этого состояния изменения параметров. Вновь отметим, что только уменьшение параметра c_1 не может вывести уровень микроРНК за пределы рассматриваемой ситуации. Таким образом, при фоновом весьма низком уровне р53 показатели микроРНК в условиях дерегуляции могут вступать в противоречие с р53-диагностикой дегенеративных, в том числе онкологических, заболеваний.

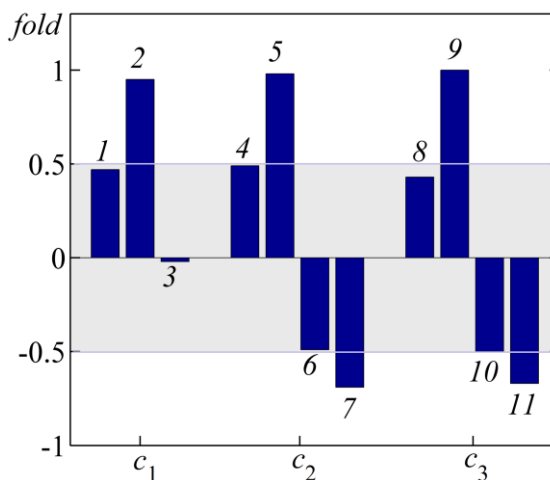


Рис. 8. Дерегуляция микроРНК в ситуации S . Изменение уровня микроРНК по отношению к характерному значению при $b_2 = 0.1b_2^b$: $c_1 = 25$ (1), 50 (2), 10^{-4} (3); $c_2 = 1.5$ (4), 2 (5), 0.5 (6), 0.3 (7); $c_3 = 0.7$ (8), 0.5 (9), 2 (10), 3 (11).

Чрезмерный рост р53 (ситуация D)

Из клинической практики известно, что при чрезмерно высоком уровне р53 (при затухании функции Mdm2 и нарушении его связи с р53) возникают условия для развития дегенеративных процессов, вызванных неконтролируемой апоптотической гибелью не только дефектных, но и здоровых клеток. Анализ микроРНК в этих условиях проводится на примере одной из характерных ситуаций, когда $b_1 = 0.1b_1^b$, а остальные параметры системы (1)–(5) принимают базальные значения (7). Особенность этих решений состоит в том, что динамика р53, Mdm2 и микроРНК характеризуется крайне медленным выходом на новый более высокий стационарный уровень.

Результаты варьирования собственной скорости генерации микроРНК $c_1 = qc_1^b$ в диапазоне значений $10^{-2} \leq q \leq 10^3$ показывают, что уровень микроРНК подтверждает прогноз, основанный на анализе состояния p53, или даже усиливает качество этого прогноза при всех q (рис. 9).

При варьировании скорости p53-индуцируемой генерации микроРНК (параметра $c_2 = qc_2^b$) наблюдается несколько иное поведение микроРНК. В достаточно широком диапазоне значений c_2 микроРНК вслед за p53 указывает на нежелательную для организма ситуацию (опасность избыточной гибели клеток и связанных с этим дегенеративных процессов, ускорения процессов старения органов или, напротив, на усиление пролиферации, если мишени микроРНК обладают свойствами, противоположными p53). В то же время, уменьшение c_2 может быть столь значительным (до $q \leq 0.01$), что значения микроРНК на достаточно большом временном интервале могут быть близкими к состоянию нормы (ситуация N^{miR}). Аналогичную картину можно наблюдать и при варьировании скорости распада c_3 , только приближение к базальному уровню микроРНК имеет место не при малых, как в случае c_2 , а при больших значениях этого параметра.

Более наглядно полученные данные представлены на рисунке 10 в виде изменений характерных уровней микроРНК по отношению к их уровню в описываемой ситуации D . Как и прежде, окрашенная область очерчивает границы допустимых изменений микроРНК, при которых существенно завышенный уровень микроРНК соответствует уровню p53. Представленные на рисунке 10 данные ясно указывают пределы изменения параметров c_1 , c_2 , c_3 , в которых сохраняется это состояние микроРНК и, следовательно, p53-обусловленные диагностические свойства. Вместе с тем, выход за пределы данной ситуации может означать и стремление к базальному уровню, что при определенных условиях (например, при наличии собственной, независимой от p53, проапоптозной функции) будет способствовать нормализации процесса гибели клеток.

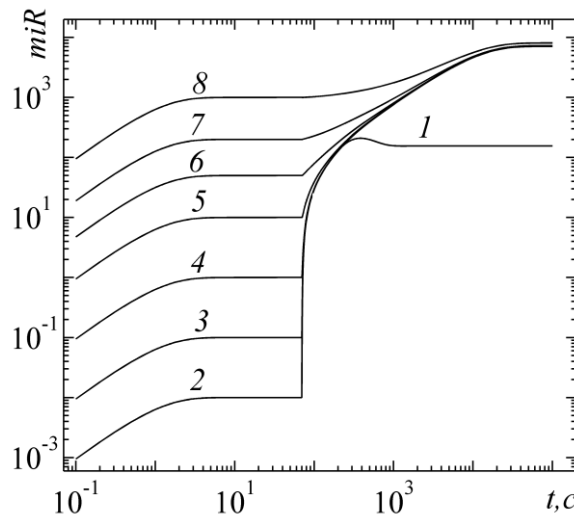


Рис. 9. Динамика микроРНК: 1 – норма (при параметрах (7)); линии 2–8 – ситуация D при $c_1 = 0.01, 0.1, 1, 10, 50, 200, 1000$ соответственно.

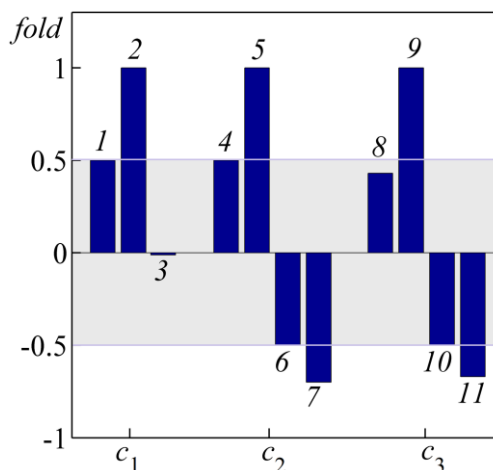


Рис. 10. Дерегуляция микроРНК в ситуации *D*. Изменение уровня микроРНК по отношению к характерному значению при $b_1 = 0.1b_1^b$: $c_1 = 3543.5$ (1), 7087 (2), 0.01 (3); $c_2 = 1.5$ (4), 2 (5), 0.5 (6), 0.3 (7); $c_3 = 0.7$ (8), 0.5 (9), 2 (10), 3 (11).

Периодические колебания концентраций p53 и Mdm2 (ситуация *R*)

Периодические колебания в сети p53–Mdm2, по результатам лабораторных наблюдений, представляют собой типичную для данной биологической системы реакцию на стресс, которая создает условия для восстановления ДНК. Соответствующие этой ситуации результаты численного исследования роли микроРНК, находящихся в прямой положительной функциональной зависимости от p53, получены в расчетах при относительно малом значении константы диссоциации $k_f = 0.022k_f^b$. Эти условия согласуются с известными экспериментальными данными [1], которые указывают на укрепление связи в сети p53–miRNA как на условие возникновения данной реакции на стрессовое воздействие.

Снижение скорости собственной генерации микроРНК $c_1 = q_1c_1^b$ (когда $q_1 < 1$), как и во всех ранее рассмотренных ситуациях, практически не влияет на вид решения и характерный уровень микроРНК. Аналогичное поведение микроРНК наблюдается и при варьировании $c_2 = q_2c_2^b$, когда $0.5 \leq q_2 < 1$. Более существенное снижение c_2 делает свойства микроРНК как фактора онкопрогноза более заметными, чем у p53. С ростом параметров $c_1 = q_1c_1^b$ или $c_2 = q_2c_2^b$ средний уровень микроРНК возрастает, так что при $q_1 \approx 100$ или $q_2 \approx 2$ значения микроРНК изменяются периодически в окрестности базального уровня y_3^b . Перечисленные зависимости весьма близки к наблюдаемым в ситуации *C* (в рамках принятой математической модели), однако есть и отличия, обусловленные характером динамического поведения p53 и, как следствие, микроРНК. При изменении параметра c_1 период и амплитуда периодических колебаний микроРНК не меняются; рост c_2 вызывает рост амплитуды при сохранении периода колебаний. Дальнейший рост q_1 или q_2 переводит микроРНК в ситуацию S^{inc} , хотя, согласно модели, при любых q_1 и q_2 уровень p53 близок к случаю *C*.

При варьировании параметра $c_3 = qc_3^b$ рост скорости распада ($q > 1$) способствует снижению, а уменьшение c_3 ($q < 1$) – существенному увеличению амплитуды колебаний микроРНК. Выход за пределы ситуации S^{dec} получен при всех $q \leq 0.35$, причем при $q \approx 0.35$ средний уровень микроРНК достигает своего базального значения

(это ситуация N^{miR}). На рисунке 11,а видно, что уже при $q \approx 0.1$ система переходит в ситуацию дисбаланса S^{inc} , а практически полное затухание распада микроРНК при $q \leq 10^{-4}$ сопровождается неуправляемым ростом микроРНК (линия 5 на рис. 11,а).

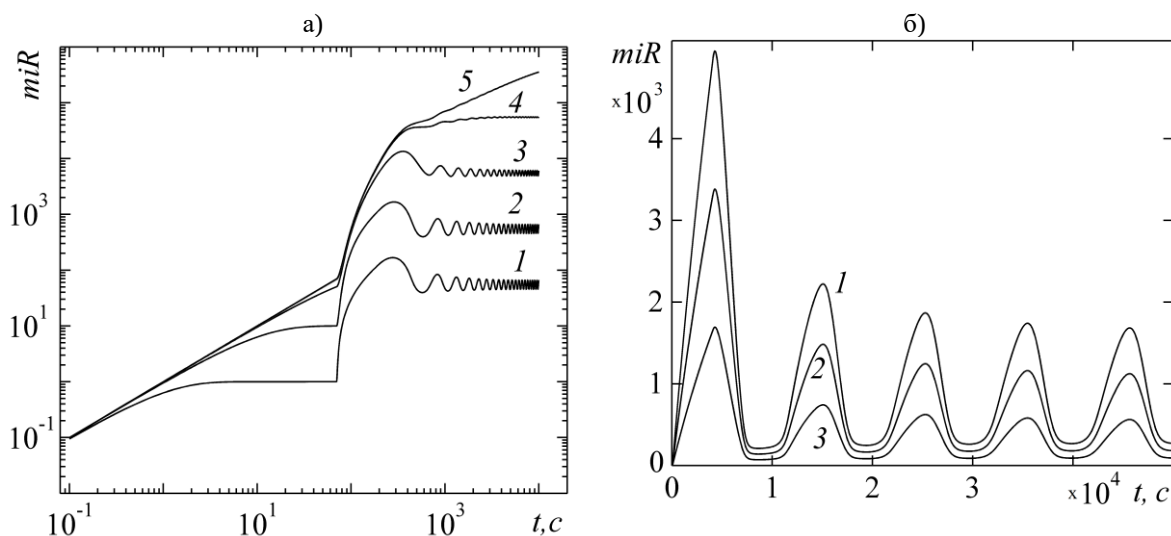


Рис. 11. Динамика микроРНК (miR) при дерегуляции: а) в ситуации R при $c_3 = 1$ (1), 0.1 (2), 0.01 (3), 0.001 (4), 0.0001 (5), $\tau_1 = 120$ с; б) в ситуации R^* при $c_2 = 1.5$ (1), 1 (2), 0.5 (3), $k_g = 400$, $\tau_1 = 4000$ с.

Дополнительно рассматривался вариант R^* периодических колебаний в сети p53–Mdm2, который реализуется только при достаточно больших значениях k_g и запаздывании $\tau_1 > 2350$ с. При этом решение задачи характеризуется достаточно большими периодами и амплитудой колебаний, а также наличием пропорционального τ_1 времени релаксации. Все эти обстоятельства определяют уровень p53 соответствующим преимущественно ситуации D , и только на относительно коротких интервалах времени – ситуации N (см. рис. 11,б). Расчеты показывают, что микроРНК повторяют динамику p53, однако, в частности, при снижении параметра c_2 ниже 0.5 возможно периодическое достижение весьма низких уровней микроРНК, соответствующих ситуации S^{dec} . Такое состояние системы p53–miRNA может оказывать негативное влияние на качество онкодиагностики в реальных условиях, если иметь в виду, что, согласно данным лабораторных исследований, параметр запаздывания τ_1 может достигать нескольких десятков часов [1, 3]. Поэтому уточнение динамического поведения микроРНК *in vitro* в норме и в стрессовых ситуациях представляется необходимым условием для адекватной оценки их роли как диагностических и прогностических биомаркеров.

Дерегуляция микроРНК в характерных ситуациях N , D , C , R (резюме)

Подводя итог, отметим основные закономерности полученных в рамках принятой математической модели свойств микроРНК с прямой положительной связью с p53. В ходе численных экспериментов показано, что если состояние сети p53–Mdm2 характеризуется как базальное, то и p53-зависимых микроРНК демонстрируют поведение, соответствующее норме. Точно так же, в критических для состояния пациента ситуациях со сверхвысоким или чрезмерно низким уровнем p53 микроРНК также принимают соответствующие экстремальные значения. Тем самым, микроРНК, вслед за p53, могут быть использованы в качестве диагностического маркера дегенеративных, в том числе онкологических, заболеваний. Вместе с тем, результаты

численных исследований в рамках принятой модели показывают, что при дерегуляции микроРНК наиболее вероятны другие ситуации, в которых характерные значения уровня микроРНК могут не соответствовать наблюдаемому уровню р53. Для наглядности на рисунках 12,а–в собраны данные об изменении уровня микроРНК по отношению к базальному в ситуациях C , D , N при различных значениях c_1 , c_2 , c_3 .

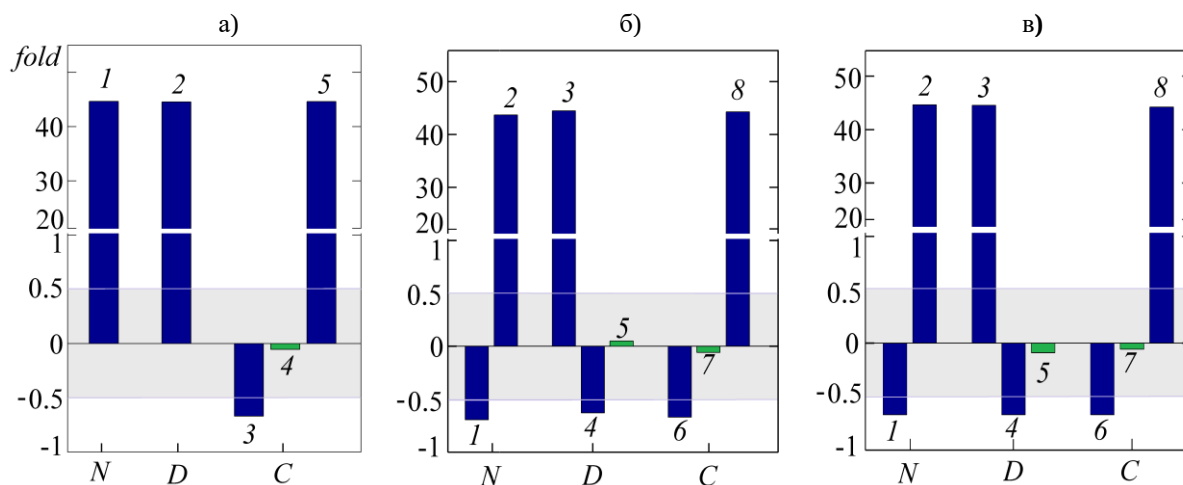


Рис. 12. Дерегуляция микроРНК в характерных ситуациях N , D , C . Изменение уровня микроРНК относительно базального: **а)** $c_1 = 6950$ (1), 1 (2), 1 (3), 100 (4), 7050 (5); **б)** $c_2 = 0.3$ (1), 45 (2), 1 (3), 0.008 (4), 0.022 (5), 1 (6), 3 (7), 140 (8); **в)** $c_3 = 3$ (1), 0.022 (2), 1 (3), 140 (4), 50 (5), 1 (6), 0.34 (7), 0.0073 (8).

На рисунке 12,а показано, что при увеличении скорости генерации микроРНК c_1 в 7000 раз в ситуациях N и C (столбцы 1 и 5) достигаются те же существенно завышенные значения микроРНК, что и при дерегуляции только р53 в ситуации D (столбец 2). При более умеренном – примерно в 100 раз – росте параметра c_1 в ситуации C получены близкие к норме значения микроРНК (столбец 4).

Данные на рисунке 12,б показывают, что нормальное значение микроРНК может достигаться при увеличении c_2 примерно втрое в ситуации C (столбец 7) или при уменьшении этого параметра не менее чем в 50 раз в ситуации D (столбец 5); при увеличении c_2 в 45 раз в ситуации N (столбец 2) или в 140 раз в ситуации C (столбец 8) достигаются те же существенно завышенные значения микроРНК, что и при дерегуляции только р53 в ситуации D (столбец 3). Заниженные значения уровней микроРНК, близкие к наблюдаемым в ситуации C при сбое р53 (столбец 6), получены в рамках принятой модели при уменьшении параметра c_2 примерно в 3 раза в ситуации N (столбец 1) или не менее чем в 100 раз – в ситуации D (столбец 4).

Согласно данным на рисунке 12,в, нормальное значение микроРНК может достигаться при уменьшении c_3 примерно втрое в ситуации C (столбец 7) или увеличении этого параметра не менее чем в 50 раз в ситуации D (столбец 5). При уменьшении c_3 минимум в 50 раз в ситуации N (столбец 2) или более чем в 100 раз в ситуации C (столбец 8) достигаются те же завышенные значения микроРНК, что и при дерегуляции только р53 в ситуации D (столбец 3). Весьма низкие значения уровней микроРНК, близкие к наблюдаемым в ситуации C при сбое р53 (столбец 6), получены в рамках принятой модели при увеличении параметра c_3 примерно в три раза в ситуации N (столбец 1) или не менее чем в 140 раз – в ситуации D (столбец 4).

Эти данные указывают, прежде всего, на то, что для каждой характерной ситуации можно указать значения скоростей генерации или деградации микроРНК, при которых

наблюдается восстановление базального уровня микроРНК ($fold \rightarrow 0$). Точно также, за счет сбоя в любом из параметров c_1 , c_2 , c_3 модели динамики микроРНК возможна существенная дерегуляция микроРНК, при которой достигаются экстремальные значения микроРНК, чаще – не соответствующие уровню p53. Поэтому уточнение динамического поведения микроРНК *in vitro* в норме и в стрессовых ситуациях представляется необходимым условием для адекватной оценки их роли как диагностических и прогностических биомаркеров.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках решения задачи об уточнении диагностических свойств известных в клинической практике онкомаркеров выполнено математическое моделирование динамики класса микроРНК, экспрессия которых обусловлена воздействием p53 (положительная прямая связь). Предложена математическая модель и выполнен численный анализ решений в широком диапазоне параметров модели.

Проведено численное исследование функционирования микроРНК в нормальных условиях и в условиях, когда p53 и его ингибитор Mdm2 принимают критические для состояния пациента значения и могут быть определены как диагностические маркеры онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Адекватность принятой математической модели и результатов численного анализа подтверждается качественным согласием с известными данными лабораторных исследований ряда конкретных микроРНК. Результаты сопоставлений дают представление о широте диапазонов изменения уровней p53, Mdm2, микроРНК и значений параметров, в которых принятую математическую модель функционирования сети p53–Mdm2–miRNA можно рассматривать как инструмент для приближенной оценки свойств p53-зависимых микроРНК с прямой положительной связью.

Согласно результатам настоящих исследований, p53-зависимые микроРНК рассматриваемого класса могут быть использованы для уточнения функции p53 как биомаркера онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Если сеть p53–miRNA функционирует нормально, то микроРНК дублируют диагностические свойства p53. Найдены варианты дерегуляции микроРНК, при реализации которых микроРНК являются даже лучшим маркером заболевания, чем p53. Вместе с тем, наиболее вероятны другие ситуации, когда дерегуляция микроРНК может приводить к установлению существенно завышенных или сверхнизких характерных уровней микроРНК, не соответствующих состоянию p53. Подобное поведение микроРНК, наблюдаемое вне связи с динамикой p53, свидетельствует о возможной самостоятельной роли микроРНК рассматриваемого класса как факторов диагностики, прогноза или терапевтической цели при нарушениях, связанных со сбоями в процессах апоптоза и пролиферации. Одновременно следует иметь в виду и возможную неоднозначность микроРНК-диагностики в этих условиях, требующих уточнения функции микроРНК.

Наши исследования, прежде всего, следует рассматривать как иллюстрацию сложного динамического поведения участников сети p53 в условиях стресса и как призыв к более глубокому изучению *in vitro* и *in vivo* микроРНК, претендующих на роль маркеров для ранней диагностики рака, болезней Альцгеймера, Паркинсона и других серьезных апоптоз-зависимых заболеваний. Ключевым остается вопрос о том, обладает ли конкретный вид микроРНК собственными, не связанными с p53, свойствами значимого регулятора упомянутых процессов. Уточнение качества микроРНК-прогноза через построение и использование усовершенствованных математических моделей может стать одним из перспективных направлений исследований, позволяющих предложить экономичные варианты исследования

способов воздействия на сеть p53–miRNA в терапевтических целях, а также пути разрешения возникающих противоречий в лабораторных и клинических данных.

Исследование выполнено при поддержке гранта ведущих научных школ НШ-7214.2016.9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lane D., Levine A. p53 research: The past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. V. 2. № 12. Article No. a000893. doi: [10.1101/cshperspect.a000893](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000893).
2. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53. *Успехи биол. химии*. 2010. Т. 50. С. 447–516.
3. 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. V. 30. № 3. P. 277–289. doi: [10.1016/j.molcel.2008.03.016](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.016).
4. He L., He X., Lim L.P., Stanchina E., Xuan Z., Liang Y., Xue W., Zender L., Magnus J., Ridzon D., Jackson A.L., Linsley P.S., Chen C., Lowe S.W., Cleary M.A., Hannon G.J. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007. V. 447. P. 05939. doi: [10.1038/nature05939](https://doi.org/10.1038/nature05939).
5. Jansson M.D., Lund A.H. MicroRNA and cancer. *Molecular oncology*. 2012. V. 6. P. 590–610. doi: [10.1016/j.molonc.2012.09.006](https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.09.006).
6. Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumor suppression. *Nature reviews cancer*. 2012. V. 12. № 9. P. 613–626. doi: [10.1038/nrc3318](https://doi.org/10.1038/nrc3318).
7. Otsuka K., Ochiya T. Genetic networks lead and follow tumor development: microRNA regulation of cell cycle and apoptosis in the p53 pathways. *BioMed Research International*. 2014. V. 2014. Article No. 749724. doi: [10.1155/2014/749724](https://doi.org/10.1155/2014/749724).
8. Chang T.-C., Wentzel E.A., Kent O.A., Ramachandran K., Mullendore M., Lee K.H., Feldmann G., Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C.J., Arking D.E., Beer M.A., Maitra A., Mendell J.T. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular Cell*. 2007. V. 26. P. 745–752. doi: [10.1016/j.molcel.2007.05.010](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.010).
9. Raver-Shapira N., Marciano E., Meiri E., Spector Ya., Rosenfeld N., Moskovits N., Bentwich Z., Oren M. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Molecular Cell*. 2007. V. 26. P. 731–743. doi: [10.1016/j.molcel.2007.05.017](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.017).
10. Tarasov V., Jung P., Verdoodt B., Lodygin D., Epanchintsev A., Menssen A., Maister G., Hermeking H. Differential Regulation of microRNAs by p53 Revealed by Massively Parallel Sequencing. *Cell Cycle*. 2007. V. 6. № 13. P. 1586–1593. doi: [10.4161/cc.6.13.4436](https://doi.org/10.4161/cc.6.13.4436).
11. Ji Q., Hao X., Zhang M., Tang W., Meng Ya., Li L., Xiang D., DeSano J.T., Bommer G.T., Fan D., Fearon E.R., Lawrence T.S., Xu L. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS ONE*. 2009. V. 4. № 8. Article No. e6816. doi: [10.1371/journal.pone.0006816](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006816).
12. Sachdeva M., Zhu S., Wu F., Wu H., Walia V., Kumar S., Elble R., Watabe K., Mo Y.-Y. P53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *PNAS*. 2009. V. 106. № 9. P. 3207–3212. doi: [10.1073/pnas.0808042106](https://doi.org/10.1073/pnas.0808042106).
13. Minones-Moyano E., Porta S., Escaram's G., Rabionet R., Iraola S., Kagerbauer B., Espinosa-Parrilla Yo., Ferrer I., Estivill X., Marti E. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Human Molecular Genetics*. 2011. V. 20. № 15. P. 3067–3078. doi: [10.1093/hmg/ddr210](https://doi.org/10.1093/hmg/ddr210).

14. Bisio A., Sanctis V., Vescovo V., Denti M., Jegga A., Inga A., Ciribilli Ya. Identification of new p53 target microRNAs by bioinformatics and functional analysis. *BMC Cancer*. 2013. V. 13. Article No. 552. doi: [10.1186/1471-2407-13-552](https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-552).
15. Goodall E., Heath P.R., Bandmann O., Kirby J., Shaw P.J. Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013. V. 7. Article No. 178. doi: [10.3389/fncel.2013.00178](https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00178).
16. Cheng C.-Y., Hwang C.-I., Corney D.C., Flesken-Nikitin A., Long-Chang J., Oner G.M., Munroe R.J., Schimenti J.C., Hermeking H., Nikitin A.Yu. MiR-34 Cooperates with p53 in Suppression of Prostate Cancer by Joint Regulation of Stem Cell Compartment. *Cell Reports*. 2014. V. 6. P. 1000–1007. doi: [10.1016/j.celrep.2014.02.023](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.023).
17. Kabaria S., Choi D.C., Chaudhuri A.D., Mouradian M.M., Junn E. Inhibition of miR-34b and miR-34c enhances α -synuclein expression in Parkinson's disease. *FEBS Lett*. 2015. V. 589. № 3. P. 319–325. doi: [10.1016/j.febslet.2014.12.014](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.12.014).
18. Iorio M.V., Visone R., Leva G., Donati V., Petrocca F., Casalini P., Taccioli C., Volinia S., Liu C.G., Alder H., Calin G.A., Menard S., Croce C.M. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*. 2007. V. 67. P. 8699–8707. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-07-1936](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1936).
19. Nikitina E.G., Urazova L.N., Stegny V.N. MicroRNAs and human cancer. *Experimental oncology*. 2012. V. 34. № 1. P. 2–8.
20. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Веряскина Ю.А., Карпинская Е.В., Шевченко С.П., Ахмерова Л.Г., Иванов М.К., Козлов В.В., Елисафенко Е.А., Гуляева Л.Ф., Жимулев И.Ф. МикроРНК, эволюция и рак. *Цитология*. 2013. Т. 55. № 3. С. 159–164.
21. Кошкин Ф.А., Чистяков Д.А., Никитин А.Г., Коновалов А.Н., Потапов А.А., Усачев Д.Ю., Пицхелаури Д.И., Кобяков Г.Л., Шишкина Л.В., Чехонин В.П. Изучение профиля экспрессии микроРНК в опухолях мозга разной степени злокачественности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014. Т. 157. № 6. С. 794–797.
22. 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. Т. 60. № 1. С. 5–14.
23. Burgos K., Malenica I., Metpally R., Courtright A., Rakela B., Beach T., Shill H., Adler C., Sabbagh M., Villa W., Tembe S., Craig D., Van Keuren-Jensen K. Profiles of Extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of Pathology. *PLoS ONE*. 2014. V. 9. № 5. Article No. e94839. doi: [10.1371/journal.pone.0106174](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106174).
24. Lukiw W.J., Andreeva T.V., Grigorenko A.P., Rogaev E.I. Studying microRNA function and dysfunction in Alzheimer's disease. *Frontiers in Genetics*. 2013. V. 3. Article No. 327. doi: [10.3389/fgene.2012.00327](https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00327).
25. Mihalas G.I., Simon Z., Balea G., Popa E. Possible oscillatory behavior in p53-Mdm2 interaction computer simulation. *J. Biol. Syst.* 2000. V. 8. №1. P. 21–29. doi: [10.1142/S0218339000000031](https://doi.org/10.1142/S0218339000000031).
26. Bar-Or R.L., Maya R., Segel L.A., Alon U., Levine A.J., Oren M. Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: A theoretical and experimental study. *PNAS*. 2000. V. 97. № 21. P. 11250–11255. doi: [10.1073/pnas.210171597](https://doi.org/10.1073/pnas.210171597).
27. 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. P. 135–140. doi: [10.1140/epjb/e2002-00271-1](https://doi.org/10.1140/epjb/e2002-00271-1).

28. Ciliberto A., Novak B., Tyson J.J. Steady states and oscillations in the p53-Mdm2 network. *Cell Cycle*. 2005. V. 4. № 3. P. 488–493. doi: [10.4161/cc.4.3.1548](https://doi.org/10.4161/cc.4.3.1548).
29. Ma L., Wagner J., Rice J., Hu W., Levine A.J., Stolovitzky G.A. A plausible model for the digital response of p53 to DNA damage. *PNAS*. 2005. V. 102. № 4. P. 014266–14271. doi: [10.1073/pnas.0501352102](https://doi.org/10.1073/pnas.0501352102).
30. Geva-Zatorsky N., Rosenfeld N., Itzkovitz Sh., Milo R., Sigal A., Dekel E., Yarnitzky T., Liron Y., Polak P., Lahav G., Alon U. Oscillations and variability in the p53 system. *Molecular Systems Biology*. 2006. V 2. № 1. Article No. 2006.0033. doi: [10.1038/msb4100068](https://doi.org/10.1038/msb4100068).
31. Chickarmane V., Ray A., Sauro H.M., Nadim A.A Model for p53 Dynamics Triggered by Damage. *SIAM J. Applied Dynamical Systems*. 2007. V. 6. № 1. P. 61–78. doi: [10.1137/060653925](https://doi.org/10.1137/060653925).
32. Qi J.P., Shao S.H., Zhu Y. A mathematical model of P53 gene regulatory networks under radiotherapy. *Biosystems*. 2007. V. 90. №. 3. P. 698–706. doi: [10.1016/j.biosystems.2007.02.007](https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2007.02.007).
33. 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. V. 30. P. 277–289. doi: [10.1016/j.molcel.2008.03.016](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.016).
34. Horhat R.F., Neamtu M., Mircea G. Mathematical models and numerical simulations for the P53-Mdm2 network. *Applied Sciences*. 2008. V. 10. P. 94–106.
35. Лихошвай В.А., Голубятников В.П., Демиденко Г.В., Фадеев С.И., Евдокимов А.А. Теория генных сетей. *Системная компьютерная биология*. Новосибирск: СО РАН. 2008. С. 395–480.
36. Golubyatnikov V.P., Mjolsness E., Gaidov Yu.A. Topological index of the p53-Mdm2 circuit. *Вестник ВОГУС*. 2009. Т. 13. № 1. С. 160–162.
37. Hamada H., Tashima Y., Kisaka Y., Iwamoto K., Hanai T., Eguchi Y., Okamoto M. Sophisticated Framework between Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction Based on p53 Dynamics. *PLoS ONE*. 2009. V. 4. № 3. Article No. e4795. doi: [10.1371/journal.pone.0004795](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004795).
38. Sun T., Chen C., Shen P. Modeling the role of p53 pulses in DNA damage- induced cell death decision. *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. Article No. 190. doi: [10.1186/1471-2105-10-190](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-190).
39. Zhang T., Brazhnik P., Tyson J. Exploring mechanisms of the DNA-damage response: p53 pulses and their possible relevance to apoptosis. *Cell Cycle*. 2007. V. 6. P. 85–94. doi: [10.4161/cc.6.1.3705](https://doi.org/10.4161/cc.6.1.3705).
40. Cai X., Yuan Z.M. Stochastic modeling and simulation of the p53-MDM2/MDMX loop. *J. Comput. Biol*. 2009. V. 16. P. 917–933. doi: [10.1089/cmb.2008.0231](https://doi.org/10.1089/cmb.2008.0231).
41. Jolma I.W., Ni X.Y., Rensing L., Ruoff P. Harmonic Oscillations in Homeostatic Controllers: Dynamics of the p53 Regulatory System. *Biophysical Journal*. 2010. V. 98. P. 743–752. doi: [10.1016/j.bpj.2009.11.013](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.11.013).
42. Lai X., Wolkenhauer O., Vera Ju. Understanding microRNA-mediated gene regulatory networks through mathematical modelling. *Nucleic Acids Research*. 2016. V. 44. № 13. P. 6019–6035. doi: [10.1093/nar/gkw550](https://doi.org/10.1093/nar/gkw550).
43. Lai X., Wolkenhauer O., Vera Ju. Modeling miRNA Regulation in Cancer Signaling Systems: miR-34a Regulation of the p53/Sirt1 Signaling Module. *Computational Modeling of Signaling Networks*. 2012. V. 880. P. 87–108. (*Methods in Molecular Biology*). doi: [10.1007/978-1-61779-833-7_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-833-7_6).
44. Moore R., Ooi H.K., Kang T., Bleris L., Ma L. MiR-192-Mediated Positive Feedback Loop Controls the Robustness of Stress-Induced p53 Oscillations in Breast Cancer Cells. *PLoS Computational Biology*. 2015. V. 11. № 12. Article No. e1004653. doi: [10.1371/journal.pcbi.1004653](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004653).

45. Jonak K., Kurpas M., Szoltysek K., Janus P., Abramowicz A., Puszynski K. A novel mathematical model of ATM/p53/NF- κ B pathways points to the importance of the DDR switch-off mechanisms. *BMC Systems Biology*. 2016. V. 10. Article No. 75. doi: [10.1186/s12918-016-0293-0](https://doi.org/10.1186/s12918-016-0293-0).
46. Luo Z., Azencott R., Zhao Y. Modeling miRNA-mRNA interactions: fitting chemical kinetics equations to microarray data. *BMC Systems Biology*. 2014. V. 8. Article No. 19. doi: [10.1186/1752-0509-8-19](https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-19).
47. Schon O., Friedler A., Bycroft M., Freund S., Fersht A. Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *Molecular Biology*. 2002. V. 323. № 3. P. 491–501. doi: [10.1016/S0022-2836\(02\)00852-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00852-5).
48. Воропаева О.Ф., Шокин Ю.И., Сенотрусова С.Д. Математическое моделирование функционирования сети онкомаркеров. Доклады VI Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика». Пущино, 16–21 октября 2016 г. Москва: Макс-Пресс, 2016. С. 102–103.
49. 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. Т. 21. № 2. С. 12–25.
50. Воропаева О.Ф., Шокин Ю.И., Непомнящих Л.М., Сенчукова С.Р. Математическое моделирование функционирования и регуляции биологической системы p53–Mdm2. Москва: Изд-во РАМН, 2014. 176 с.
51. Воропаева О.Ф., Сенчукова С.Р., Бродт К.В., Гарбузов К.Е., Мельниченко А.В., Старикова А.А. Численное моделирование ультрадианных колебаний в биологической системе p53-Mdm2 в условиях стресса. *Математическое моделирование*. 2014. Т. 26. № 11. С. 105–122.
52. Воропаева О.Ф., Шокин Ю.И., Непомнящих Л.М., Сенчукова С.Р. Математическое моделирование функционирования системы белков p53–Mdm2. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014. Т. 157. № 2. С. 261–264.
53. Воропаева О.Ф., Шокин Ю.И., Непомнящих Л.М., Сенчукова С.Р. Математическое моделирование регуляции биологической системы p53-Mdm2. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014. Т. 157. № 4 С. 539–542.

Рукопись поступила в редакцию 16.01.2017.
Дата опубликования 13.04.2017.